

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

**Estudos de complementação
fenotípica do mutante *pso2-1* de
Saccharomyces cerevisiae
pelos genes *uvr* de *Escherichia
coli***

Cassius Frosi Lenzi

**Orientadores: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques
Prof. Dra. Jenifer Saffi**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências.

Porto Alegre, Maio de 2005

Aos meus pais, Elias e Romilda, os responsáveis por todas as conquistas da minha vida. Obrigado pelo apoio, pela confiança, e pelo incentivo nos momentos mais difíceis deste trabalho. Espero sempre poder corresponder às suas expectativas...

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

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Henriques, pela orientação, ensinamentos, apoio e pela oportunidade única de realizar este trabalho. Muito obrigado pela confiança e paciência.

A minha co-orientadora Dra. Jenifer Saffi, pela oportunidade, ensinamentos, ajuda, contribuição intelectual para a realização deste trabalho, mas principalmente pela orientação e incentivo nos momentos mais difíceis. Serei sempre muito grato pela grande oportunidade e por não me fazer desistir.

Ao colega Diego Bonatto, indispensável na elaboração deste trabalho, pela ajuda e ensinamentos nos experimentos de Biologia Molecular, pelo auxílio decisivo no desenvolvimento de todas as etapas deste trabalho e pela correção dos capítulos da dissertação. Obrigado pela atenção e paciência.

Ao colega Renato Moreira Rosa, fundamental para o término deste trabalho, pela ajuda e dedicação na elaboração dos experimentos de mutagênese e sobrevivência, bem como na essencial contribuição intelectual para a realização deste trabalho. Com certeza, sem sua ajuda não teria sido possível.

Ao Dr. Luis Fernando Revers da EMBRAPA – Bento Gonçalves pelos ensinamentos, e pelo auxílio essencial no início deste trabalho.

Às colegas Jaqueline Cardone, Heique Bogdwa e Cassiana Viau pela ajuda, ensinamentos, mas principalmente pelo convívio amigável nestes 3 anos, apesar do meu rádio AM.

Ao meu primo Lucas Breda Frosi, mais amigo que parente, pela indispensável ajuda na preparação de seminários e demais atividades administrativas deste trabalho. O que seria daquelas figuras sem você... Obrigado pela enorme paciência e incentivo. Espero um dia poder retribuir.

Ao amigo de tantos anos, Sandro Sawicki. Pela amizade, pelos conselhos, pelo auxílio com aquela máquina terrível, o computador, mas, principalmente às longas e acaloradas discussões sobre os mais diversos assuntos...

Aos meus irmãos Dimas e Andressa, que mesmo longe estiveram presentes e tiveram suas vidas, ainda que indiretamente, afetadas por toda esta jornada. Muito obrigado e desculpe pelos transtornos.

A todos os colegas dos laboratórios 210, 219 e GENOTOX.

Ao Prof. Rafael Roesler, pela rapidez e presteza na correção da redação científica.

Ao Prof. Luiz Augusto Basso pelo auxílio como membro da Comissão de Acompanhamento.

À Sílvia e o Luciano, da Secretaria do PPGBCM pela importante ajuda, por aguentarem minhas seguidas trocas de datas do seminário de dados.

Ao Prof. Arthur Germano Fett Neto, coordenador do PPGBCM pela paciência.

A todos que de uma maneira ou outra colaboraram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática de um anel ciclobutano entre 2 timinas na mesma cadeia de DNA e um Fotoproduto 6-4, produzido pela ligação entre o C6 de uma timina e C4 de uma timina adjacente.....26
- Figura 2.** Representação esquemática da fotoadição de furocumarinas ao DNA. Após a intercalação da molécula de psoraleno entre os pares de bases do DNA, um fóton de 365 nm é absorvido gerando uma monoadição. Monoadições do tipo 4',5' permitem a absorção de um segundo fóton de 365 nm e uma segunda fotoadição do tipo 3,4 pode ocorrer no anel cumarínico, gerando uma ponte intercadeia 28
- Figura 3.** Modelo molecular do mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) em *Escherichia coli*.....35
- Figura 4.** Esquema demonstrativo do funcionamento de um teste em gotas45
- Figura 5.** Primers específicos utilizados para amplificação dos genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* de *E. coli* a partir do DNA genômico.....48
- Figura 6.** Mapa do Vetor de Expressão pVT103-U utilizado para o clonagem dos genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* de *E. coli*.....49
- Figura 7.** Mapa do vetor de clonagem pZErO^R-2 (Invitrogen), utilizado para a clonagem dos produtos de PCR de 2,6 kb, 2,1 kb, e 1,8 kb correspondentes aos genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* de *E. coli*.....50
- Figura 8.** Amplificação por PCR dos fragmentos correspondentes a seqüência dos genes *uvrA*, e *uvrB* de *E. coli* DH5 α57

Figura 9. Amplificação por PCR do fragmento correspondente a seqüência do gene <i>uvrC</i> de <i>E. coli</i> DH5 α	57
Figura 10. Triagem dos clones recombinantes (plasmídeo pZErO ^R -2 contendo os insertos de 2.600 pb e 1.800 pb, correspondentes aos genes <i>uvrA</i> e <i>uvrC</i> , respectivamente).....	58
Figura 11. Triagem dos clones recombinantes (plasmídeo pZErO ^R -2 contendo o inserto de 2.100 pb, correspondente ao gene <i>uvrB</i>).....	59
Figura 12. Clivagem do inserto relativo ao gene <i>uvrC</i> clonado no plasmídeo pVT103-U.....	60
Figura 13. Clivagem do inserto relativo ao gene <i>uvrB</i> clonado no plasmídeo pVT103U.....	60
Figura 14. Análise da expressão gênica em levedura por RT-PCR.....	61
Figura 15. Sensibilidade das diferentes linhagens à UVC.....	62
Figura 16. Sensibilidade das diferentes linhagens à 3-CPs + UVA.....	63
Figura 17. Sensibilidade das diferentes linhagens à 8-MOP + UVA.....	63
Figura 18. Sobrevivência das linhagens mutante <i>ps02-1</i> e selvagem transformadas com o plasmídeo vazio e contendo os genes <i>uvrB</i> e <i>uvrC</i> após tratamento com 3-CPS fotoativado.....	64
Figura 19. Sobrevivência das linhagens mutante <i>ps02-1</i> e selvagem transformadas com o plasmídeo vazio e contendo os genes <i>uvrB</i> e <i>uvrC</i> após tratamento com 8-MOP fotoativado.....	65

Figura 20. Sobrevivência das linhagens mutante *ps02-1* e selvagem transformadas com o plasmídeo vazio e contendo os genes *uvrB* e *uvrC* após tratamento com UVC.....66

Figura 21. Indução de mutantes *can1^R* nas linhagens selvagem e mutante transformadas com o plasmídeo vazio e contendo o gene *uvrB* e *uvrC* após tratamento com UVC em função da dose.67

Figura 22. Indução de mutantes *can1^R* nas linhagens selvagem e mutante transformadas com o plasmídeo vazio e contendo o gene *uvrB* e *uvrC* após tratamento com 8-MOP + UVA em função da dose.....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos de epistasia dos genes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> envolvidos em reparação de danos no DNA.....	19
Tabela 2. Propriedades das proteínas codificadas pelos genes <i>PSO</i> e os fenótipos dos seus alelos mutantes.....	30
Tabela 3. Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas para a realização deste estudo.....	41
Tabela 4. Linhagens de <i>Escherichia coli</i> utilizadas para a realização deste estudo.....	42
Tabela 5. Vetores de uso em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Escherichia coli</i>	42

LISTA DE ABREVIATURAS

3-CPs	3-carbetoxipsoraleno
4-NQO	óxido de 4-nitroquinoleína
8HQ	8-hidroxiquinolina
8-MOP	8-metoxipsoraleno
µg	micrograma
µL	microlitro
Amp	ampicilina
Can	canamicina
C-C	dímero de pirimidina citosina-citosina
cDNA	ácido desoxiribonucléico complementar
CPD	dímero de pirimidinas ciclobutano
SC	Síndrome de Cockaine
Da	Dalton
DNA	ácido desoxiribonucléico
dNTPs	desoxiribonucleosídeos trifosfatados
DSB	quebras duplas do DNA
EMS	etil metanosulfonato
ERO	espécie reativa de oxigênio
HN1	mustarda nitrogenada monofuncional
HN2	mustarda nitrogenada bifuncional
ICL	ponte intercadeia
kb	quilobases
kDa	quilodaltons
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
MNNG	N-metil-N ¹ -nitro-N-nitrosoguanidina

MMS	metilmetano sulfonato
NER	reparação por excisão de nucleotídeos
nm	nanômetros
°C	graus Celsius
ORFs	quadro aberto de leitura
pb	par de bases
PCR	reação de polimerização em cadeia da polimerase
PIBIDS	Tricodistrofia
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	reação de polimerização em cadeia da polimerase mediada pela transcriptase reversa
TCR	reparo acoplado a transcrição
T-T	dímero de pirimidina timina-timina
Ura	uracila
UV	radiação ultravioleta
UVA	radiação ultravioleta longa (365nm)
UVC	radiação ultravioleta curta (254nm)
V(D)J	processo de recombinação não homóloga ilegítima que resulta na junção de extremidades de DNA e está envolvida em diversidade imune celular
XP	Xeroderma pigmentosum
YEPD	meio rico de cultura de leveduras

INDICE

LISTA DE FIGURAS.....	06
LISTA DE TABELAS.....	09
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
Resumo.....	15
Abstract.....	16
1.INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Vias de reparação de DNA.....	18
1.1.1. Reparação por excisão de nucleotídeos (NER).....	20
1.1.2. Reparação pós-replicativa e mutagênica.....	21
1.1.3. Reparação de DNA por recombinação homóloga.....	22
1.1.4. Reparação de DNA por recombinação não-homóloga ou ilegítima.....	23
1.2. Agentes que lesionam a célula.....	25
1.2.1. Radiação UV.....	25
1.2.2. Psoralenos/furocumarinas.....	26
1.3. Mutantes <i>pso</i>	29
1.4. Reparação de lesões no DNA de <i>Escherichia coli</i>	34
1.4.1. Genes <i>uvrA</i> , <i>uvrB</i> e <i>uvrC</i>	34
2.OBJETIVOS.....	40
2.1. Objetivo geral.....	40
2.2. Objetivos específicos.....	40
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1. Linhagens e plasmídeos.....	41
3.2. Meios de cultura.....	42
3.3. Agentes químicos.....	43
3.4. Estoque das culturas.....	44
3.5. Condições de crescimento.....	44

3.6. Teste em gotas qualitativo	44
3.7. Curvas de sobrevivência.....	45
3.7.1. Preparação das suspensões celulares.....	45
3.7.2. Tratamento com 3-CPs e 8-MOP + UVA.....	46
3.7.3. Tratamento com radiação UVC.....	46
3.8. Determinação da frequência de revertentes his ⁺ e de mutação para frente “forward mutation”	46
3.9. Métodos relacionados a ácidos nucleicos.....	47
3.9.1. Extração de DNA genômico.....	47
3.9.2. Amplificação do fragmento de interesse pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).....	47
3.10. Clonagem dos fragmentos amplificados no vetor pZErO ^r -2.....	50
3.10.1. Purificação dos fragmentos amplificados.....	50
3.10.2. Ligação do fragmento amplificado no vetor pZErO ^r -2.....	50
3.10.3. Preparação de células cálcio competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	51
3.10.4. Transformação de células cálcio competentes de <i>E. coli</i> DH5 α com o plasmídeo pZErOr-2.....	51
3.10.5. Seleção dos recombinantes.....	52
3.11. Subclonagem dos genes <i>uvrA</i> , <i>uvrB</i> e <i>uvrC</i> no vetor pVT103-U de expressão em levedura.....	52
3.11.1. Transformação de células cálcio competentes de <i>E. coli</i> DH5 α com o plasmídeo pVT103-U.....	52
3.11.2. Seleção do recombinantes.....	53
3.11.3. Transformação de células de <i>S. cerevisiae</i> com o vetor de expressão.....	53
3.12. Análise da expressão gênica.....	53
3.12.1. Preparação do fenol ácido.....	53
3.12.2. Extração de RNA de leveduras.....	54
3.12.3. Análise da expressão gênica utilizando a técnica da transcrição reversa associada a PCR (RT-PCR).....	54

4. RESULTADOS.....	56
4.1. Amplificação dos genes <i>uvrA</i> , <i>uvrB</i> e <i>uvrC</i> de <i>E. coli</i> DH5 α utilizando a técnica de PCR.....	56
4.2. Clonagem dos fragmentos <i>uvrA</i> , <i>uvrB</i> e <i>uvrC</i> no vetor plasmideal pZErO ^r -2.....	57
4.3. Subclonagem dos genes <i>uvrA</i> , <i>uvrB</i> e <i>uvrC</i> no vetor de expressão em <i>S. cerevisiae</i> pVT103-U.....	59
4.4. Expressão dos genes <i>uvrB</i> e <i>uvrC</i>	61
4.5. Análise fenotípica do mutante <i>pso2-1</i> de <i>S. cerevisiae</i> transformado com pVT103-U:: <i>uvrB</i> e pVT103-U:: <i>uvrC</i>	62
4.5.1. Sensibilidade do mutante <i>pso2-1</i> de <i>S. cerevisiae</i> e da linhagem selvagem ao efeito letal de diferentes agentes mutagênicos.....	62
4.5.2. Sobrevivência após a adição de furocumarinas mono (3-CPs + UVA) e bi-funcionais (8-MOP + UVA).....	65
4.5.3. Sobrevivência após tratamento com radiação UVC.....	66
4.6. Indução de mutação para frente “forward mutation”.....	66
5. DISCUSSÃO.....	69
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	74
7. REFERÊNCIAS.....	76

RESUMO

O mecanismo de reparação de DNA por excisão de nucleotídeos (NER) é o mais universal e conservado sistema de reparação encontrado em organismos procarióticos e eucarióticos. Em bactérias, a via NER é mediada pelos produtos dos genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC*, conhecido como complexo *UvrABC*. A atuação das proteínas Uvr pode ser dividida em quatro passos básicos: reconhecimento do dano e verificação da lesão; incisão; excisão do fragmento danificado; síntese de reparo e ligação.

O mutante *ps02-1* de *Saccharomyces cerevisiae* foi um dos primeiros mutantes isolados sensíveis especificamente aos tratamentos com agentes indutores de pontes intercadeias (ICLs), tais como 8-MOP+UVA e mustarda nitrogenada (HN2). O exato mecanismo de participação da proteína Pso2p no reparo de ICLs ainda permanece desconhecido e, portanto, a continuidade da sua caracterização é essencial para compreender melhor os mecanismos e produtos gênicos envolvidos na reparação de ICLs em *S. cerevisiae*. Além disso, alguns estudos recentes com os mutantes de *Escherichia coli uvrA*, *uvrB* e *uvrC* mostraram uma hipersensibilidade do mutante *uvrB* à 8-MOP + UVA, bem como a incapacidade de reconstituir DNA de alta massa molecular, característica esta semelhante ao fenótipo do mutante *ps02-1* de *S. cerevisiae*.

Neste trabalho, é apresentada a subclonagem e a expressão dos genes *uvrB* e *uvrC* de *E. coli* no mutante *ps02-1* de *Saccharomyces cerevisiae*, com o objetivo de testar os fenótipos de sensibilidade e mutagênese deste mutante frente a alguns agentes genotóxicos. Os genes *uvrB* e *uvrC* foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico de uma linhagem selvagem de *E. coli*, subclonados no vetor de expressão de levedura pVT103-U, sendo a transformação realizada por meio de choque térmico nas linhagens *ps02-1* e selvagem de *S. cerevisiae*. A análise de complementação fenotípica e mutagênica foi realizada frente aos psoralenos fotoativados (8-MOP+UVA e 3-CPs+UVA) e radiação UVC. A análise da expressão dos genes *uvrB* e *uvrC* foi desenvolvida com o emprego da técnica de RT-PCR. Os dados mostram que, apesar da presença dos transcritos *uvrB* e *uvrC* no mutante *ps02-1* de *S. cerevisiae*, não houve restauração dos fenótipos de resistência e mutagênese para ICLs, um possível indicativo de ausência de similaridade funcional entre as proteínas UvrB, UvrC e Pso2p.

ABSTRACT

Nucleotide excision repair (NER) is a universal and highly conserved DNA repair pathway found in prokaryotes and eukaryotes. In bacteria, NER is mediated by *uvrA*, *uvrB* and *uvrC* gene products, composing the UvrABC protein complex. The role of Uvr proteins can be divided in four basic steps: damage recognition, dual incision, repair synthesis and ligation.

The mutant *pso2-1* was primarily isolated by its specific sensitivity to agents that produce interstrand cross-links (ICLs), like 8-MOP + UVA and nitrogen mustard (HN2). The exact mechanism of how Pso2p participate in the ICL repair is unclear, and its characterization is essential to understand the mechanisms and the gene products related to ICL repair. Some recent studies with *uvrA*, *uvrB* and *uvrC* *E. coli* strains indicated that the *uvrB* strain is hypersensitive to 8-MOP + UVA and it is incapable to restore the high molecular weight DNA, like the *pso2-1* yeast mutant.

In this work we have carried out the subcloning and expression of *E. coli* *uvrB* and *uvrC* genes in the *S. cerevisiae* *pso2-1* mutant with the purpose to test the sensitivity and mutagenesis of transformed yeast strains after treatment with genotoxic agents. The *uvrB* and *uvrC* genes were amplified by PCR from an *E. coli* wild-type (WT) strain, subcloned into the yeast expression vector pVT103-U and transformed in the WT and *pso2-1* yeast strains by heat shock. The analysis of phenotypic complementation was performed with photoactivated psoralens (8-MOP+UVA and 3-CPs+UVA) and UVC. The expression analysis of *uvrB* and *uvrC* was carried out the RT-PCR technique. The results show that the *E. coli* *uvrB* and *uvrC* genes cannot complement the yeast *pso2-1* mutant, despite the presence of *uvrB* and *uvrC* transcripts. These results indicate that the proteins UvrB, UvrC and Pso2p probably do not share a functional similarity.

1. INTRODUÇÃO

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

Qualquer modificação na estrutura molecular do DNA pode interferir no seu metabolismo, incluindo replicação, transcrição e recombinação, tão bem quanto outras funções celulares importantes tais como regulação do ciclo celular e/ou divisão celular (Taylor e Lehmann, 1998; Resnick e Cox, 2000).

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

Vários mecanismos de reparação celular envolvendo etapas multienzimáticas são capazes de remover rapidamente diferentes tipos de lesões produzidas no DNA de acordo com a natureza química do agente genotóxico (Taylor e Lehmann, 1998). Estas lesões, se não forem reparadas ou o forem de maneira incorreta, podem trazer sérias consequências, resultando em infidelidade na replicação, mutações, aumentando o risco de um indivíduo a várias doenças degenerativas. Gerada pela infidelidade na reparação de lesões no DNA, a instabilidade genômica pode permitir alterações genéticas relevantes para o desenvolvimento do câncer. Um grande progresso está sendo alcançado em todas as áreas de reparação, especialmente com células de mamíferos, e leveduras continuam sendo um excelente paradigma para reparação em humanos. Quase todas as vias de reparação e a maioria dos *loci* individuais são significativamente homólogos desde leveduras até mamíferos (para revisão ver Taylor e Lehmann, 1998; Resnick e Cox, 2000).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um excelente microorganismo eucariótico para estudos biológicos (Hieter, 1998; Resnick e Cox, 2000). A seqüência completa de seu genoma mostrou-se extremamente vantajosa como uma referência voltada para o seqüenciamento de genes humanos e de outros eucariotos superiores (Goffeau *et al.*, 1996). É um organismo unicelular, que apresenta um ciclo eucariótico típico e completo bem definido. A capacidade desta levedura de replicar-se tanto em estado diplóide como em estado haplóide e a facilidade de obter-se mutantes faz deste organismo um dos modelos eucarióticos melhor caracterizados geneticamente quanto à resposta celular aos danos provocados no DNA. Além disso, a fácil manipulação genética de leveduras permite sua utilização para convenientemente analisar e funcionalmente dissecar produtos de genes de outros eucariotos (Ausubel *et al.*, 1995; Burke *et al.*, 2000).

Diversos processos celulares fisiologicamente conservados entre as diferentes espécies de eucariotos, combinado às potentes ferramentas genéticas e moleculares disponíveis para *S. cerevisiae* fazem desta levedura um importante modelo, permitindo sua utilização para análise funcional de produtos de genes de outros eucariotos (Taylor e Lehmann, 1998., Resnick e Cox, 2000).

1.1. VIAS DE REPARAÇÃO DE DNA

O estudo dos mecanismos de reparação de lesões no DNA de leveduras iniciou com o isolamento de uma série de mutantes sensíveis aos efeitos das radiações UVC e ionizante, chamados mutantes *rad* (Game e Cox, 1971; Game e Mortimer, 1974). O grande número de genes identificados e o isolamento de outros mutantes sugeriram a presença de múltiplas vias para a reparação de lesões induzidas por radiações. O estudo de alelismo entre simples mutantes sensíveis às radiações, bem como das interações de epistasia e sinergismo entre duplos e triplos mutantes estabeleceram três grupos genéticos de reparação de lesões (Game e Cox, 1971; Brendel e Haynes, 1973; Game e Mortimer, 1974), os quais correspondem às três principais respostas celulares referentes aos danos no DNA: reparação por excisão ressíntese, via RAD3, também conhecida por NER (*nucleotide excision repair*), reparação por recombinação, via RAD52 e reparação pós-replicativa e/ou mutagênica, via RAD6 (para revisão, ver Friedberg *et al.*, 1995; Nickoloff e Hoekstra, 1998; Prakash e Prakash, 2000; Game, 2000; Kupieck, 2000).

Os grupos de epistasia dos genes envolvidos no processo de reparação são mostrados na Tabela 1.

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

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

Grupo RAD3	Grupo RAD6	Grupo RAD52
<i>RAD1</i>	<i>RAD5 (REV2) (SNM2)</i>	<i>RAD50</i>
<i>RAD2</i>	<i>RAD6 (UBC2)</i>	<i>RAD51</i>
<i>RAD3</i>	<i>RAD8</i>	<i>RAD52</i>
<i>RAD4</i>	<i>RAD9</i>	<i>RAD53</i>
<i>RAD7</i>	<i>RAD15</i>	<i>RAD54</i>
<i>RAD10</i>	<i>RAD18</i>	<i>RAD55</i>
<i>RAD14</i>	<i>RADH (SRS2)</i>	<i>RAD56</i>
<i>SSL1</i>	<i>REV1</i>	<i>RAD57</i>
<i>SSL2 (RAD25)</i>	<i>REV3 (PSO1)</i>	<i>RAD58</i>
<i>TFB1</i>	<i>CDC9</i>	<i>RAD59</i>
<i>RAD16 (PSO5)</i>	<i>REV5</i>	<i>PSO4 (PRP19)</i>
<i>RAD23</i>	<i>REV6</i>	<i>RAD24</i>
<i>CDC8</i>	<i>REV7</i>	<i>XRS2</i>
<i>CDC9</i>	<i>CDC7</i>	
<i>MMS19</i>	<i>CDC8</i>	
<i>PSO2 (SNM1)</i>	<i>MMS3</i>	
<i>PSO3 (RNR4)</i>	<i>PSO4 (PRP19)</i>	
<i>UVS12</i>	<i>UMR-7</i>	
<i>RAD26</i>		
<i>CDC44</i>		
<i>RFA1</i>		

Adaptado de (Friedberg *et al.*, 1995, Brendel e Henriques, 2001, Brendel *et al.*, 2003). Os genes entre parênteses são alelos.

1.1.1. Reparação por excisão de nucleotídeos (NER)

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

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

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

Na levedura *S. cerevisiae* fazem parte do NER vários genes que codificam proteínas essenciais para o reconhecimento da lesão e incisão do DNA, tais como os genes *RAD1*, *RAD2*, *RAD3*, *RAD4*, *RAD10*, *RAD14*, *SSL1*, *SSL2/RAD25*, *TFB1*, *TFB2* e *TFB3*. Alterações em quaisquer desses genes levam a um aumento na sensibilidade das células de levedura à ação de diversos mutagênicos, principalmente a radiação UVC. Além dessa, há uma outra classe de genes não essenciais ao NER como *RAD7*, *RAD16*, *RAD23*, *RAD24* e *MMS19*. Mutações nestes genes apresentam sensibilidade moderada a UVC e a outros agentes

causadores de lesões ao DNA; os efeitos adversos sobre a incidência de danos no DNA são menores do que em mutantes de genes essenciais (Bang *et al.*, 1992; Sweder e Hanawalt, 1992; Friedberg *et al.*, 1995; Prakash e Prakash, 2000).

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

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

1.1.2. Reparação pós-replicativa e mutagênica

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

O DNA lesado normalmente bloqueia a maquinaria de replicação, entretanto a replicação da fita lesada pode ocorrer pela síntese translesão, na qual uma DNA polimerase especializada, presumidamente mais tolerante às alterações na estrutura molde que as replicases normais, insere um nucleotídeo correto ou incorreto no lado oposto à base lesada e então prolonga a cadeia (Johnson *et al.*, 1999b; Prakash *et al.*, 2000; Lawrence *et al.*, 2000). A parada da maquinaria de replicação no sítio da lesão pode também resultar na formação de uma lacuna na nova fita sintetizada no lado oposto a lesão. Esta lacuna é sintetizada por meios recombinacionais ou não recombinacionais que utiliza o DNA duplex homólogo não lesado (Prakash *et al.*, 2000).

Mutantes deste grupo em geral são sensíveis à radiação UVC e ionizante (para revisão, ver Henriques e Moustacchi 1980; 1981; Moustacchi *et al.*, 1983; Averbek *et al.*, 1992;

Nickoloff e Hoekstra 1998; Game 2000), apresentando uma redução ou bloqueio na mutagênese induzida por diversos agentes (Prakash 1976; Lawrence 1994; Nickoloff e Hoekstra, 1998; Game 2000). Alguns são defectivos em reparação de DNA pós-replicativa, presumidamente devido a um fracasso ou a uma falha para fechar as lacunas no DNA fita simples no lado oposto à lesão (Bailly *et al.*, 1997; Nickoloff e Hoekstra, 1998).

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

Os genes *REV* constituem a bem definida via de síntese translesão que replica o DNA, sintetizando lesões, com baixa fidelidade (Lawrence e Hinkle, 1996). Um grande número de evidências aponta para a existência de uma via livre de erro, pós-replicativa, distinta da mutagênica. A via mediada por *RAD5/REV2* é tida como livre de erro, pois uma deleção no gene *RAD5* não interfere fortemente na mutagênese induzida por UV. Os genes *RAD5* e *POL30* foram designados para duas vias de reparação pós-replicativa distintas baseados na interação sinérgica entre os mutantes *rad5* e *pol30-46* (Xiao *et al.*, 2000).

1.1.3. Reparação de DNA por recombinação homóloga

Existem muitas evidências de que a tolerância aos danos no DNA, associada aos mecanismos recombinacionais, é iniciada por quebras de cadeias. As quebras de cadeias duplas ou “double strand breaks” (DSBs) são uma importante forma de danos no DNA que, se mal reparadas, podem resultar em deleções mutagênicas, rearranjos ou translocações, (Parshad e Sanford, 2001) e, se não reparadas, podem levar a perdas de cromossomas e morte celular (Friedberg *et al.*, 1995; Nickoloff e Hoekstra, 1998). A reparação de lesões na fita simples de DNA de leveduras é realizada utilizando imediatamente a fita complementar acessível como modelo, mas isso não é possível para DSBs (Friedberg *et al.*, 1995), que podem ser reparadas pela ligação direta para prevenir perda de cromossomos e aumentar a sobrevivência celular, mas com um custo mutagênico, se impreciso (Pâques e Haber, 1999). Alternativamente, a reparação de DSBs pode ser realizada com alta fidelidade através de recombinação homóloga (Shinohara e Ogawa, 1998). Genes envolvidos em vias recombinacionais são conservados entre eucariotos superiores e inferiores. O mesmo é verdadeiro para o mecanismo recombinacional (Friedberg *et al.*, 1995). Células diplóides apresentam maior resistência aos efeitos das radiações ionizantes do que células haplóides, e

células haplóides em fase G2 do ciclo celular, durante a replicação do DNA, são mais resistentes do que células em fase G1 (Nickoloff e Hoekstra, 1998). Os genes de *S. cerevisiae* que participam do processo de reparação recombinacional são colocados no grupo de epistasia liderado pelo gene *RAD52*. Os alelos defectivos dos genes deste grupo conferem especial sensibilidade à radiação ionizante e a produtos químicos que induzem quebras de cadeia do DNA, mas não são sensíveis nem mostram alteração de frequências mutagênicas após irradiação com UVC (Nickoloff e Hoekstra, 1998).

As DSBs são induzidas por uma variedade de agentes que danificam DNA, incluindo radiações ionizantes, químicos radiomiméticos, ou, indiretamente, pela remoção de agentes intercalantes como furocumarinas, mostardas nitrogenadas e metilmetano sulfonato, ou ainda pela remoção de lesões muito próximas, mas em cadeias opostas (Magaña-Schwencke *et al.*, 1982; Game 1993; Nickoloff e Hoekstra, 1998; Game 2000).

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

1.1.4. Reparação de DNA por recombinação não-homóloga ou ilegítima

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é 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 mamíferos, o processo de reparação de DSBs por recombinação não-homóloga é catalizado principalmente pelo complexo conhecido como proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK) (revisão em Game, 2000). Este complexo é composto pelo heterodímero KU70/KU80, conhecido como KU (Smith e Jackson, 1999), que interage fortemente com a subunidade catalítica desse complexo denominada DNA-PKcs (uma proteína de 465 kDa) (Smith e Jackson, 1999).

Em *S. cerevisiae*, ainda não foi descrita nenhuma subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA (Game, 2000). Entretanto, existe um heterodímero homólogo de Ku, chamado de Hdf ou γ Ku, a qual possui também uma grande afinidade por DNA (Feldmann e Winnacker, 1993). Os genes que codificam para as duas subunidades (de 70 e 80kDa) foram clonados pela sua alta afinidade de ligação à extremidades de DNA livres (do inglês: “high affinity DNA-binding factor” – HDF) e foram denominados HDF1 e HDF2, respectivamente ou γ -Ku70 e γ -Ku80A (Feldmann e Winnacker, 1993; Feldmann *et al.*, 1996). Fenótipos de seus

respectivos mutantes foram associados à reparação de DNA e recombinação ilegítima em *S. cerevisiae* (Feldmann *et al.*, 1996; Smith e Jackson, 1999).

A formação do DSBs faz com que o heterodímero Ku se ligue às extremidades do DNA, recrutando a DNA-PKcs ao sítio da lesão e desencadeando também mudanças na estrutura da cromatina (Kanaar *et al.*, 1998). Em *S. Cerevisiae*, as proteínas Sir2, Sir3 e Sir4 estão envolvidas neste processo e, em mamíferos pode ocorrer uma modificação similar a esta, de remodelação da cromatina, levando a formação de uma estrutura semelhante a de uma heterocromatina condensada em volta da lesão (Kanaar *et al.*, 1998). Após a junção (reparação) das duas extremidades, a autofosforilação de DNA-PKcs causa uma mudança estrutural neste complexo, desmontando-o. Nos últimos estágios, o complexo formado pelos produtos dos genes RAD50, MRE11 e XRS2 também é atraído ao sítio da lesão, auxiliando no processamento das extremidades e religação (Kanaar *et al.*, 1998). 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).

Um segundo mecanismo de indução de DSBs está relacionado ao aumento da diversidade imunológica adaptativa em vertebrados mandibulados, sendo que a reparação destas quebras é realizada por uma via recombinacional especializada denominada de recombinação V(D)J. Este tipo de recombinação é característico de células linfóides, e baseia-se na introdução de DSBs em seqüências sinalizadoras de recombinação (*recombination signal sequences* ou RSSs) que flanqueiam os loci que codificam para os receptores das células T e B (TCR e BCR, respectivamente), e para as imunoglobulinas (Ig) (Gellert, 2002).

1.2. AGENTES QUE LESIONAM A CÉLULA

1.2.1. Radiação UV

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

(Friedberg *et al.*, 1995). Os danos gerados por radiação UV mais comumente estudados são os dímeros de pirimidina e os fotoprodutos 6-4 (Figura 1).

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

Estes dímeros são extremamente estáveis mesmo em pHs e temperaturas extremas, inclusive após hidrólise ácida do DNA. Entretanto, a formação de dímeros durante irradiação de DNA é um processo reversível que se mantém em equilíbrio, sendo mais freqüente a formação de dímeros de pirimidinas entre as timinas do que entre as citosinas, sendo quase 70% T-T, 15%T-C e 3% C-C (Friedberg *et al.*, 1995). Os CPDs provocam grandes distorções na hélice de DNA, provocando uma parada obrigatória na replicação, devido à impossibilidade de inserir bases para formar pontes de hidrogênio estáveis (Chan *et al.*, 1985; Friedberg *et al.*, 1995).

Semelhante à formação de dímeros de pirimidina, após a exposição à UVC pode ocorrer uma ligação entre o C6 de uma timina e o C4 da timina adjacente, gerando um fotoproduto 6-4, que causa uma maior distorção na estrutura do DNA (Taylor *et al.*, 1988; Friedberg *et al.*, 1995). São lesões álcali-lábeis. Essa ligação ocorre mais freqüentemente entre as citosinas (T-C, C-C) do que entre as timinas (T-T), porém não entre C-T. A metilação da citosina na posição C-5 aparentemente inibe a formação de fotoprodutos 6-4 (Friedberg *et al.*, 1995).

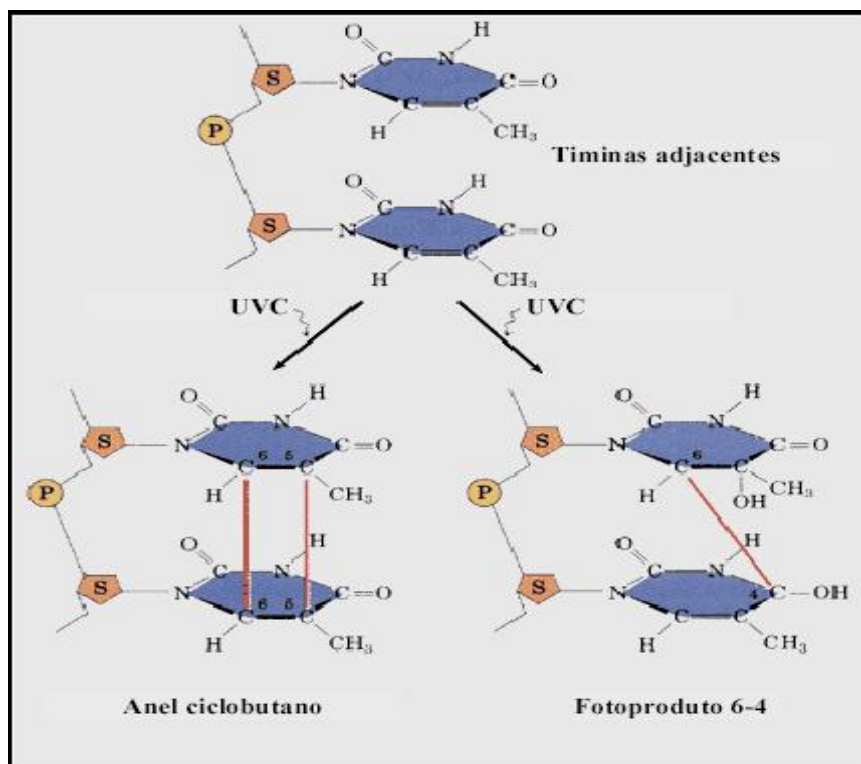


Figura 1. Representação esquemática de um anel ciclobutano entre 2 timinas na mesma cadeia de DNA e um Fotoproduto 6-4, produzido pela ligação entre o C6 de uma timina e o C4 da timina adjacente.

1.2.2. Psoralenos/Furocumarinas

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

Os psoralenos intercalam-se entre os pares de bases do DNA de maneira reversível através de interações químicas de natureza fraca, como forças de Van der Waals e pontes de hidrogênio. Na presença de luz UV de 365nm (UVA), adicionam-se às bases pirimídicas, principalmente timinas, através de ligações covalentes, formando adutos. Estas fotoadições podem ocorrer na forma de mono ou biadições, dependendo da estrutura molecular da furocumarina. (Figura 2).

Nas monoadições, a dupla ligação C5-C6 da base pirimídica liga-se à dupla ligação C3-C4 do núcleo cumarínico (monoadições do tipo 3,4) ou à dupla ligação C4-C5 do grupo furano (monoadições do tipo 4',5') (Figura 2). As monoadições do tipo 3,4 são incapazes de absorver

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

Exemplos desses agentes, denominados monofuncionais, são o 3-CPs e a Angelicina (Averbeck 1984; Averbeck *et al.*, 1992; Friedberg *et al.*, 1995; Henriques *et al.*, 1997).

Através dessas fotoadições, as furocumarinas podem causar diversos efeitos genotóxicos ao DNA, resultando em letalidade, mutagênese e recombino gênese em organismos procariotos e eucariotos (Averbeck *et al.*, 1992; Dronkert *et al.*, 2001; Greenberg *et al.*, 2001; Brendel *et al.*, 2003).

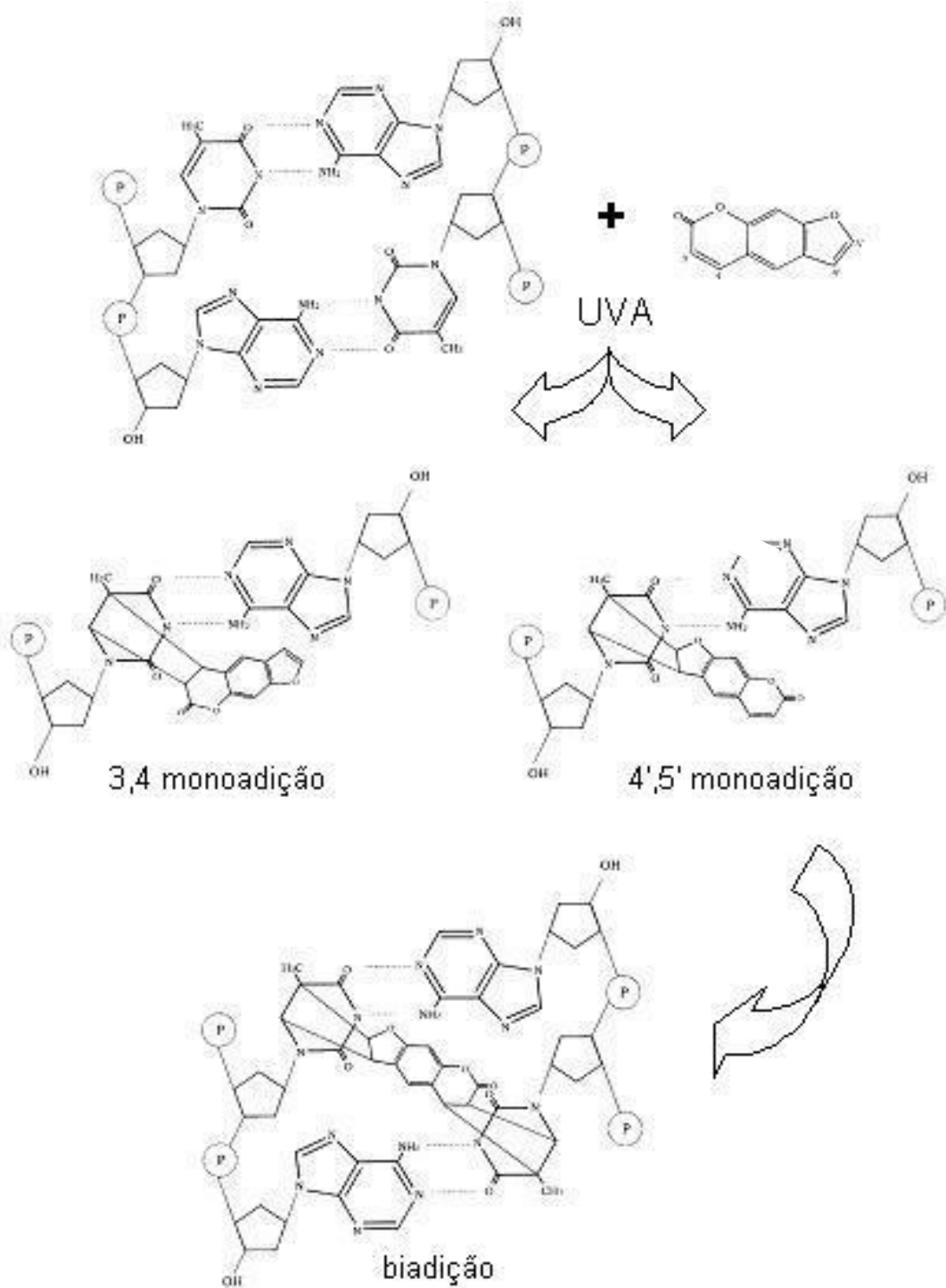


Figura 2. Representação esquemática da fotoadição de furocumarinas ao DNA. Após a intercalação da molécula de psoraleno entre os pares de bases do DNA, um fóton de 365 nm é absorvido gerando uma monoadição. Monoadições do tipo 4',5' permitem a absorção de um segundo fóton de 365 nm e uma segunda fotoadição do tipo 3,4 pode ocorrer no anel cumarínico, gerando uma ponte intercadeia.

1.3. MUTANTES PSO

A fotoquimioterapia empregando psoralenos+UVA (PUVA terapia) é largamente utilizada para tratar desordens dermatológicas, desde dermatites atópicas à psoríase e vitiligo (Horio, 2000; Greenberg *et al.*, 2001). Os produtos formados pela fotoativação de psoralenos nos fibroblastos da pele são responsáveis pela eficácia deste tratamento (PUVA), devido a sua alta citotoxicidade na replicação celular (Greenberg *et al.*, 2001). Entretanto, embora a PUVA terapia seja efetiva no tratamento da psoríase, os fotoprodutos resultantes desta associação (psoraleno+UVA) inibem o metabolismo do DNA, causam mutações, DSBs e danos cromossômicos, podem induzir apoptose e um elevado risco de câncer de pele, de um modo dose-dependente (Greenberg *et al.*, 2001; Dronkert e Kanaan, 2001).

Com o objetivo de estudar as consequências fotoquímicas, biológicas e genéticas do tratamento PUVA, em células vivas, Henriques e Moustacchi (1980), isolaram a partir de uma população de células mutagenizada com etil metanosulfonato (EMS), uma nova classe de mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* sensíveis à fotoadição de psoralenos mono- (3-CPs) e bi-funcionais (8-MOP): os mutantes *pso*. A análise molecular desses genes e a caracterização fenotípica de seus alelos mutantes têm progredido consideravelmente. Atualmente, dez genes *PSO* estão caracterizados fenotipicamente. As características dos genes *PSO1* a *PSO10* estão apresentadas na Tabela 2 (para revisão, ver Brendel *et al.*, 2003).

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

<i>Gene/Alelo</i>	Proteína (kDa)/Função	Fenótipo do mutante
<i>PSO1/REV3</i>		

	173; subunidade da DNA polimerase ζ	sensível à radiação e a agentes mutagênicos químicos baixa mutabilidade
<i>PSO2/SNM1</i>	72; possível envolvimento na clivagem de hairpins durante o reparo de ICL	sensível ao tratamento com todos os agentes indutores de ICL baixa mutabilidade com agentes produtores de ICL
<i>PSO3/RNR4</i>	40,1; subunidade pequena da ribonucleotídeo redutase	redução na mutabilidade induzida e recombinação; células não atingem a fase estacionária de crescimento
<i>PSO4/PRP19</i>	56,7; proteína associada a spliceossoma	sensível a agentes mutagênicos, não recombina em mitose, baixa mutabilidade e defectivo em esporulação
<i>PSO5/RAD16</i>	91,3; DNA helicase envolvida em NER (Reparo Global do Genoma)	sensível à UVC e lesões oxidativas mutabilidade normal; envolvido em controle do envelhecimento
<i>PSO6/ERG3</i>	43; ergosterol desaturase	sensível a danos oxidativos
<i>PSO7/COX11</i>	28; associa-se ao complexo citocromo-oxidase	células sensíveis à 4-NQO

<i>PSO8/RAD6</i>	19,5; enzima conjugada a ubiquitina	sensível à UVC e a vários agentes mutagênicos; mutagênese reduzida
<i>PSO9/MEC3</i>	53,2; envolvida na regulação do controle do ciclo celular	sensível a vários agentes mutagênicos; mutagênese reduzida; esporulação normal
<i>PSO10</i>	Desconhecida	sensível a vários agentes mutagênicos; mutagênese reduzida bloqueado em esporulação

O mutante *pso2-1* foi um dos primeiros isolados sensíveis especificamente aos tratamentos com 8-MOP +UVA (Henriques e Moustacchi, 1980) e mustarda nitrogenada (HN2) (Ruhland *et al.*, 1981). Posteriormente, quando o alelismo entre os genes *PSO2* e *SNM1* foi estabelecido (Cassier e Moustacchi, 1988), ficou claro que uma proteína Pso2/Snm1 não funcional conferia um novo fenótipo: sensibilidade específica à agentes mutagênicos citotóxicos bi- ou poli-funcionais. Estudos moleculares demonstraram que o gene *PSO2/SNM1* codifica uma proteína nuclear não essencial de 76kDa, com um domínio do tipo dedos de zinco, característico de proteínas ligantes ao DNA. Isto pode, contudo, não ser importante para sua função em remover ICLs, uma vez que sua remoção mutacional manteve a resistência da célula semelhante à selvagem para sensibilidade a HN1 (Haase *et al.*, 1989). Mais recentemente, foram identificados outros domínios conservados entre genes ortólogos ao *PSO2* em vários outros organismos. As análises *in silico* destes domínios levou à definição de uma família de proteínas/enzimas cujos substratos são especificamente ácidos nucleicos (DNA ou RNA) (Moshous *et al.*, 2001; Callebaut *et al.*, 2002). A recente identificação de ortólogos do gene *PSO2* ligados à susceptibilidade à câncer de próstata e defeitos na recombinação V(D)J associada à imunodeficiência severa em humanos (Tavtigian *et al.*, 2001; Moshous *et al.*, 2001, Ma *et al.*, 2002) indica que sua função associada à manutenção da integridade do DNA é conservada desde cedo na evolução. O gene *PSO2* é pouco transcrito (aproximadamente 0,3

transcritos/célula) (Richter *et al.*, 1992), mas pode ser induzido cerca de quatro vezes mais por mutágenos que produzam ICL, incluindo UVC, mas não por agentes alquilantes monofuncionais como MNNG e pelo agente UV mimético 4-NQO (Wolter *et al.*, 1996). De forma similar a mutantes de reparação pós-replicativa (ou translesão), mas contrastando com mutantes da via NER, o mutante *psb2-1* é proficiente no processo de incisão perto de sítios de DNA contendo ICL no locus transcritionalmente ativos *MAT α* , mas não faz o mesmo no locus silencioso *HML α* , sugerindo uma associação de *PSO2* com NER de genes transcritionalmente ativos (Meniel *et al.*, 1995). Mutantes *psb2/snm1* são capazes de cortar próximo às pontes intercadeias fotoinduzidas, mas não são capazes de reconstituir DNA de alta massa molecular. Esta característica indica um bloqueio na etapa pós-excisão do mecanismo de reparação de ICL no DNA, independente de sua natureza química (Magaña-Schwencker *et al.*, 1982; Wilborn e Brendel, 1989). A sensibilidade de mutantes *psb2/snm1* é independente do tipo de base envolvida na formação de ICLs (Brendel *et al.*, 2003). Dependendo do mutágeno usado, pode existir uma grande diferença na estabilidade de ICL, e a indução de mutagênese e recombinação mitótica podem ser total ou parcialmente bloqueadas (Brendel e Henriques, 2001).

De forma similar a mutantes deficientes na via de reparação recombinacional, os mutantes *psb2* não mostram resistência aumentada na fase G2 do ciclo celular no estado haplóide ou diplóide como observado para linhagens selvagens (Wilborn e Brendel, 1989; Henriques e Moustacchi, 1980). Recombinação induzida por dano também é reduzida em mutantes *psb2* tratados com 8-MOP + UVA mas não depois de tratados com mostarda nitrogenada monofuncional (Saeki *et al.*, 1983). O reparo de ICL induzidas por psoralenos em DNA plasmidial exógeno não é afetado em mutantes *psb2*, contrastando com mutantes de via de reparação NER e recombinacional (Magaña-Schwencke e Averbek, 1991). Isto sugere que *Pso2p* pode estar envolvida em alguma instância com modulação da cromatina. As investigações conduzidas com os mutantes *psb2* sugerem que este gene pode desempenhar sua função em uma via de reparação mutagênica ou recombinacional que é específica para ICL e que difere do “padrão” conhecido para as vias de reparação por recombinação ou pós-replicativa. O exato mecanismo de como a proteína *Pso2p* participa no reparo de ICL ainda permanece desconhecido, portanto a continuidade na sua caracterização é essencial para compreender melhor os mecanismos e produtos gênicos envolvidos na reparação de ICLs em *S. cerevisiae*. Estudos recentes mostraram que a presença de um motivo de β -lactamase na extremidade C-terminal da *Pso2p*, permitem sua inclusão na família de proteínas β -CASP, que possuem ácidos nucléicos como substrato comum (Callebaut *et al.*, 2002). Esta família

compreende enzimas de reparo eucarióticas e proteínas que processam RNA (Callebaut *et al.*, 2002). Estudos filogenéticos indicam uma relação entre Pso2p/Snm1p e as proteínas RAG-1/RAG-2, conhecidamente envolvidas na recombinação V(D)J, e que são caracterizadas como proteínas com atividade endonucleolítica e de fosfotransferase (Ma *et al.*, 2002). Estes achados sugerem um novo papel para Pso2p no reparo de DNA, atuando provavelmente na clivagem de hairpins formados quando a forquilha de replicação é bloqueada na região próxima ao ICL (Brendel *et al.*, 2003). Mais recentemente estudos de interações protéicas utilizando o sistema dois-híbrido mostraram que a proteína Pso2p interage com as proteínas codificadas pelo gene *PAK1* e pelas ORFs, *YHR80c* e *YJL084c* (Revers, 2003. Dados não publicados). A proteína Pak1p foi mostrada como importante para reparo de DNA, sendo o mutante *pak1Δ* sensível a psoralenos bifuncionais e a UVC. A análise da interação gênica entre *PSO2* e *PAK1* mostrou que ambos são epistáticos para a via de reparação por excisão de nucleotídeos - NER. Novos experimentos estão sendo conduzidos para demonstrar a qual via de reparo o gene *PAK1* pode ser melhor enquadrado, bem como para estudar de que forma *PSO2* e *PAK1* interagem em um contexto de recombinação homóloga e reparo do tipo NHEJ. Por sua vez, *YHR80c* e *YJL084c*, apesar de pouco estudados, não mostraram uma interação gênica significativa com Pso2p.

A sensibilidade do mutante *pso2Δ* frente a acetaldeído (ACA) foi analisada e comparada com outras drogas causadoras de danos ao DNA por meio de ensaios de expressão de beta-Gal e análise fenotípica. Concluiu-se que este mutante possui uma sensibilidade elevada para ACA. Foi mostrado que ACA possui a capacidade de se intercalar na fita de DNA, gerando pontes intra e intercadeias e, além disso, que ACA é gerado como um metabólito da via glicolítica de *S. cerevisiae*.

1.4. REPARAÇÃO DE LESÕES NO DNA DE *E. coli*

1.4.1. Genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC*

O DNA nas células é fortemente associado com uma grande variedade de proteínas que servem para manter a estrutura organizacional do material genético e coordenar respostas celulares incluindo replicação, reparo, recombinação e transcrição (Minko *et al.*, 2001). Desde componentes endógenos como peroxidação lipídica, passando por substâncias presentes no ambiente, compostos químicos carcinogênicos, luz ultravioleta, podem produzir danos na estrutura do DNA (Van Houten *et al.*, 2002).

O mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), é o mais universal e conservado sistema de reparo encontrado em organismos procariotos e células eucarióticas (Theis *et al.*, 2000). Sua grande vantagem é a habilidade de atuar sobre uma gama variada de lesões, originárias dos mais diversos tipos de agentes, ao contrário de outros mecanismos presentes em sistemas procarióticos (Skorvaga *et al.*, 2004). Mutações ou deficiências em genes específicos da via NER podem levar a envelhecimento precoce e desenvolvimento de câncer em humanos (Van Houten *et al.*, 2002). O NER em sistemas procarióticos e eucarióticos opera baseado nos mesmos princípios, apenas ocorrendo a substituição das proteínas envolvidas (Cleaver *et al.*, 2001). Em bactérias, o NER é mediado pelo produto dos genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC*, conhecido como complexo *UvrABC*, sendo dividido em quatro passos básicos: reconhecimento do dano e verificação da lesão; incisão; excisão do fragmento danificado; síntese de reparo e ligação, mecanismo este descrito há 40 anos atrás (revisado por Van Houten *et al.*, 2002.) (Figura 3).

Modelo do mecanismo de NER em *E. coli*

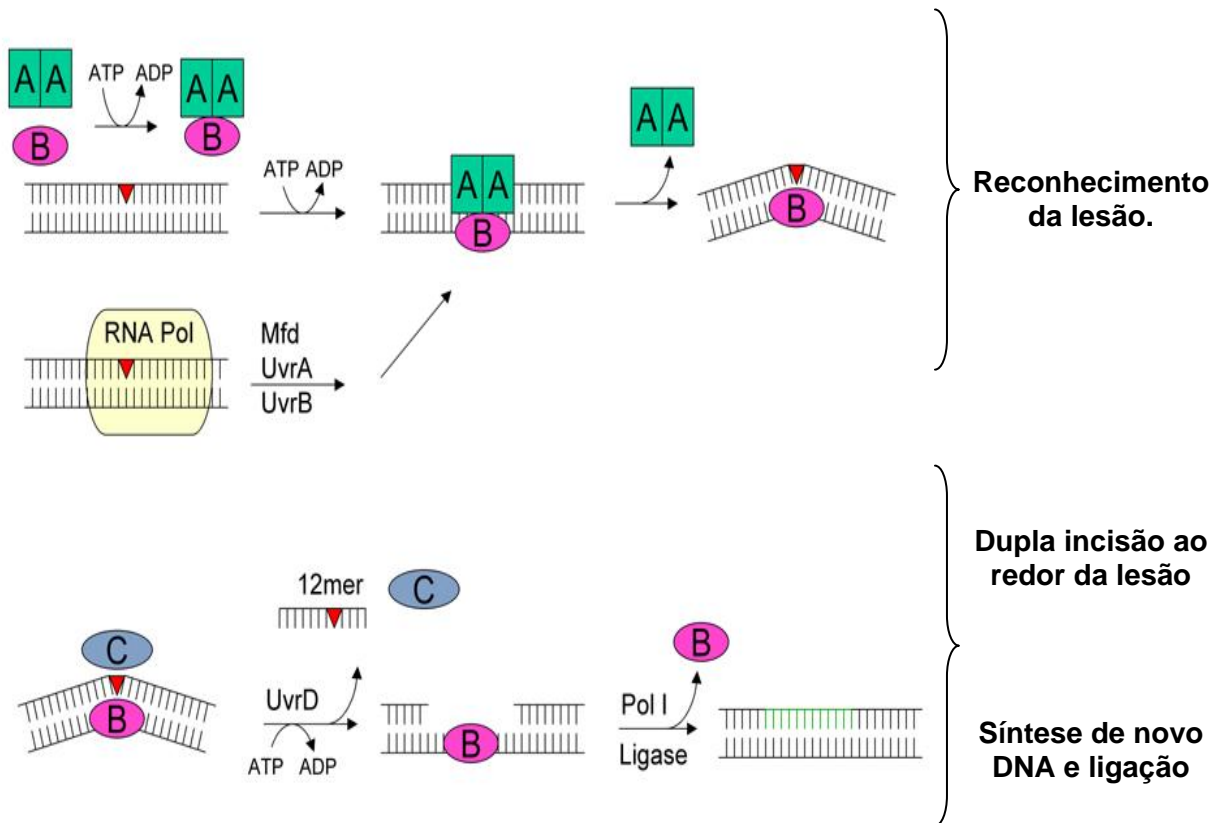


Figura 3. Modelo molecular do mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) em *Escherichia coli*. As principais etapas desta via estão descritas e as proteínas envolvidas estão representadas esquematicamente.

O gene *uvrA* pertence a uma série de genes chamados genes SOS, os quais são induzidos por substâncias que produzem danos no DNA. Esta expressão é regulada por um repressor, produto do gene *lexA*, que se liga em uma região específica presente no operador – promotor do gene. (Sancar *et al.*, 1982). O gene *uvrA* constitui um simples operon contendo dois genes separados por 253 pb, *uvrA* e *ssb* (que codifica uma proteína de ligação a DNA de fita simples), que são transcritos independentemente. O sítio onde se liga o repressor *lexA* está localizado nesta região intergênica e é requerido para a regulação de *uvrA*, mas não está envolvida na expressão de *ssb*. Há somente vinte e cinco moléculas da proteína *uvrA* constitutivas em *E. coli*, mas mediante ativação do sistema SOS os níveis aumentam para aproximadamente duzentas e cinquenta unidades por célula (Van Houten, 1990).

O produto do gene *uvrA* é uma ATPase independente de DNA e uma proteína de ligação ao DNA. Estas características correlacionam-se com motivos estruturais presentes na seqüência nucleotídica. A composição dos aminoácidos revelou a presença de duas

seqüências consenso, chamadas Walker tipo A e B, encontradas em muitas proteínas que ligam ou hidrolizam ATP, sendo as seqüências Tipo A mais conservadas. Uma análise mais detalhada da composição nucleotídica mostrou uma região de 250 aminoácidos com homologia a um variado número de ATPases, sugerindo que a proteína *UvrA* é um membro de uma superfamília da ATPases procarióticas, muitas delas atuando na membrana plasmática, resistência a drogas, divisão celular, transporte de proteínas, recombinação e replicação (Doolittle *et al.*, 1986). Possui dois motivos tipo Dedo de Zinco e um motivo Hélice-Volta-Hélice (Wang e Grossman, 1993). Ambos os motivos são importantes na ligação da proteína ao DNA. Dos 940 aminoácidos presentes na estrutura protéica, a região de 230 aa localizada na porção N-terminal é requerida para a interação com a proteína *UvrB*, enquanto que para a sua auto-dimerização é necessário os outros 680 aminoácidos (Claasen *et al.*, 1991), sendo, no entanto, necessária a quase totalidade dos 940 aminoácidos para a ligação no DNA.

O gene *uvrB* também é um membro da família SOS, entretanto, apresenta regulação mais complexa (Schendel *et al.*, 1982). Sua transcrição parece ser controlada por um sistema SOS-dependente e SOS-independente, envolvendo a sobreposição de dois promotores, P1 e P2 (Fogliano e Schendel, 1981). O sítio de ligação da proteína *lexA* está presente na região promotora, funcionando *in vitro* como operador para P2, pelo fato de que a transcrição é inibida pela presença do repressor *LexA*, enquanto não é afetada em P1. Entretanto, evidências *in vivo* indicam que P1 é responsável pelos níveis constitutivos e induzíveis da proteína *UvrB*, servindo P2 para regular a transcrição do primeiro (Van der Berg *et al.*, 1983).

Codificando um polipeptídeo de 673 aminoácidos, com massa molecular de 76 kDa (Arikan *et al.*, 1986), *uvrB* exerce um papel fundamental nas funções de ligação no DNA, reconhecimento do dano, e incisão mediado por *uvrC*, sendo a proteína central do NER em bactérias (Skorvaga *et al.*, 2004). A estrutura de *UvrB* consiste de cinco domínios (Theis *et al.*, 2000). Conectado entre a superfície de dois domínios da proteína *UvrB* encontra-se o sítio de ligação de ATP, sendo a estrutura destes muito semelhante às helicases pertencentes as superfamílias I e II, sugerindo similaridade na função de ligação de ATP e hidrólise (Theis *et al.*, 2000). A estrutura das helicases na presença e ausência de cofator e, ou DNA, mostram orientações distintas dos dois domínios que ligam ATP, indicando que a translocação do complexo na etapa de reconhecimento do dano é acoplada a hidrólise de ATP (Hall e Matson, 1999). Dois domínios interagem com *UvrA* e *UvrC*, enquanto o último domínio está relacionado na ligação ao DNA. Estudos recentes têm demonstrado que o motivo de β -hairpin é o componente chave das funções exercidas por *UvrB*. Mutações pontuais e deleções na estrutura deste domínio, ainda sustentam a capacidade da proteína de se ligar ao DNA, formar

complexo com *UvrA* e até aumentam a atividade de ATPase quando comparados com a linhagem selvagem. Por outro lado, o mutante não consegue separar as fitas do DNA, posicionar-se na região danificada e executar a incisão do fragmento lesado ao formar complexo com *UvrC* (Skorvaga *et al.*, 2004).

O gene *uvrC* codifica um polipeptídeo de 610 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 68,5 kDa (Lin e Sancar, 1990), apresentando como *uvrA* e *uvrB*, expressão constitutiva em um nível baixo, aproximadamente dez a vinte moléculas por célula. Não pertence ao grupo dos genes SOS, nem sua transcrição é aumentada quando a célula sofre lesão por qualquer agente (Forster e Strike, 1985). De estrutura química mais simples, não apresenta domínios de ligação no DNA, nem do tipo Dedos de Zinco. Após a formação do complexo entre *UvrA* e *UvrB*, *UvrC* é recrutada para realizar a incisão nas duas extremidades do fragmento lesado. Comparações de seqüências e experimentos de mutagênese sítio-dirigida, demonstraram que ambas as incisões, 5' e 3', são realizadas por sítios catalíticos distintos, que podem ser inativados de maneira independente (Lin e Sancar, 1992). A extremidade N-terminal possui todos os componentes para a realização da incisão da região 3', enquanto a porção C-terminal engloba os componentes para realizar a clivagem 5' (Verhoeven *et al.*, 1999).

O aspecto fundamental da especificidade do NER é a capacidade da maquinaria de reparo localizar e identificar a base ou região lesada no genoma, processo chamado de reconhecimento dano-específico. Em *E.coli*, este entrave é superado pela interação das proteínas *UvrA* e *UvrB*, e suas relações com o DNA.

Em solução, *UvrA* dimeriza para tornar-se *UvrA*₂, sendo a capacidade de ligação a ATP dos monômeros a responsável pela formação do dímero (Moolenaar *et al.*, 2001). *UvrA*₂ interage então com *UvrB*, para formar o complexo *UvrA*₂*B*. Embora o dímero de *UvrA* tenha a habilidade de reconhecer lesões no DNA, acredita-se que somente o complexo *UvrA*₂*B* possa ser identificado pela maquinaria de reparo do NER (Theis *et al.*, 2000). A proteína *UvrA* funcionaria como uma molécula marcadora, direcionando *UvrB* para o local correto. Dentro deste contexto, estudos recentes têm mostrado um modelo onde o motivo de β -hairpin de *UvrB* seria a chave para o reconhecimento e processamento da lesão (Skorvaga, 2002). Neste sistema, o complexo *UvrA*₂*B* se ligaria ao DNA, percorreria a molécula devido a sua atividade de helicase ao encontro da região lesada em íntimo contato com os domínios de ATPase de *UvrB*, β -hairpin e de ligação ao DNA. Caso a lesão não fosse encontrada, o complexo seria dissociado do DNA. Ocorrendo a localização pelas proteínas, mudanças conformacionais seriam desencadeadas na região lesada, que está em contato com *UvrA*, passando por um

mecanismo ainda não totalmente esclarecido a interagir com *UvrB* (Zou e Van Houten, 1999). Desta maneira, alterações conformacionais ocorreriam nas proteínas e no DNA. Durante a fase de reconhecimento do dano, acredita-se que *UvrA* hidroliza ATP e dissocia-se do complexo *UvrA₂B*, ou *UvrB* mesmo poderia ativar a liberação de *UvrA* da maquinaria de reparo, permitindo a formação do complexo estável *UvrB*-DNA. Uma vez formado o complexo estável com a liberação de *UvrA*, a proteína *UvrC* através dos seus dois sítios catalíticos independentes, liga-se ao complexo e promove os eventos de incisão. A porção N-terminal é responsável pela clivagem de quatro a cinco nucleotídeos das proximidades da região 3', enquanto a extremidade C-terminal corta oito nucleotídeos da região 5', liberando um fragmento de doze nucleotídeos contendo a lesão (Lin e Sancar, 1992). Diversos trabalhos têm mostrado que as duas incisões são estruturalmente diferentes: a incisão na região 3' requer a ligação de ATP, ao passo que na porção 5' a ativação pode ocorrer via ATP ou ADP (Zwetsloot *et al.*, 1986); para ocorrer a incisão 3' é necessário a interação de *UvrC* com *UvrB*, enquanto a ausência de interação na extremidade 5' não altera a capacidade de clivagem (Moolenaar *et al.*, 1997); mutantes *UvrC* com substituições simples de aminoácidos ainda mantêm a capacidade de cortar na região 3', ao contrário da 5' (Lin e Sancar, 1992).

Após a incisão pelo complexo *UvrABC*, a helicase *UvrD* procede a excisão do oligonucleotídeo lesado, antes ou durante a síntese de reparo, normalmente realizada pela DNA polimerase I. A DNA ligase sela a molécula na região 3' e encerra o processo.

Estudando o comportamento dos mutantes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC*, Lage *et al.*, (2003), obtiveram resultados interessantes. Experimentos *in vitro* indicaram que o mutante *uvrB* é hipersensível ao tratamento com mitomicina C e PUVA, quando comparado com a linhagem selvagem e os mutantes *uvrA* e *uvrC*. Diferente de outros agentes quimioterápicos, mas similar ao reparo com UVC, os três mutantes apresentaram a mesma sensibilidade quanto tratados com mustardas nitrogenadas. Análise dos perfis de sedimentação em gradiente de sacarose alcalino, demonstraram que o mutante *uvrB* quando tratado com mitomicina C e PUVA, mantêm a capacidade de cortar o ICL, mas é bloqueado na etapa de ressíntese, não conseguindo restaurar DNA de alto peso molecular, comportamento semelhante ao apresentado pelo mutante *pso2-1* de *S. cerevisiae*. Estes dados sugerem que os processos de incisão no DNA lesado não dependem da ação conjunta de *UvrB* e *UvrC* (Lage *et al.*, 2003). O produto do gene *uvrB* atuaria apenas na etapa de reconstituição de DNA de alta massa molecular (Lage *et al.*, 2003).

Estas novas observações projetam um novo papel para a proteína *UvrB*, independente da sua função previamente descrita no complexo *UvrABC*, que poderia ser específico para o reparo de monoadutos, biadutos intra-cadeia e ICL (Lage *et al.*, 2003).

O elevado grau de conservação dos sistemas de proteção e defesa da célula entre organismos procariotos e eucariotos (Jazayeri e Jackson, 2003), permite a transferência horizontal de genes que codificam proteínas de reparo em organismos inferiores para outros de maior complexidade. Usando-se vetores especiais, é possível expressar genes de reparo da bactéria *E. coli*, em *Saccharomyces cerevisiae*, com o objetivo de aumentar a resposta frente a alguns tipos de lesões em linhagens competentes, ou para restaurar parcial ou totalmente os fenótipos de sensibilidade em linhagens mutantes em qualquer sistema de reparação (Brozmanova *et al.*, 2004). Os experimentos de expressão heteróloga têm sido muito úteis para o estudo de genes que codificam fatores de reparo (Brozmanova *et al.*, 2004), tanto na caracterização de aspectos bioquímicos e genéticos de numerosas proteínas, como na identificação de novos genes através desta estratégia de clonagem. Como exemplo, pode-se citar a expressão heteróloga de alguns genes em *S. cerevisiae*, como o gene *ada*, que codifica uma DNA –metiltransferase, proteína envolvida no reparo de alquilações produzidas no DNA; a restauração dos fenótipos selvagens do mutante *ps04-1* de *S. cerevisiae* pelo gene *recA* de *E. coli* (Morais *et al.*, 1994); e a complementação do fenótipo de sensibilidade à peróxido de hidrogênio (H₂O₂) do mutante *ps03-1* de *S. cerevisiae* pelo gene *nth* de *E. coli*. (Brozmanova *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este projeto teve como propósito avaliar a possível complementação dos fenótipos de sensibilidade do mutante *pso2-1* de *Saccharomyces cerevisiae* pelos genes *uvr* de *Escherichia coli*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificação dos genes *uvr* a partir de uma linhagem selvagem de *Escherichia coli*, e clonagem em vetor de expressão em levedura.
- Transformação de linhagens selvagens e mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* para o gene *PSO2*, com os plasmídeos contendo os genes *uvr*, seguido de ensaios de complementação e análise de expressão para alguns fenótipos de sensibilidade e de mutagênese do mutante *pso2-1*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LINHAGENS E PLASMÍDEOS

As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* utilizadas nesse trabalho encontram-se descritas na tabela 3 e 4, respectivamente. Nas rotinas de laboratório, para propagação e amplificação plasmideal foram utilizadas as linhagens bacterianas DH5 α e TOP10.

Os vetores plasmideais de uso em *S. cerevisiae* e *E. coli* utilizados neste estudo encontram-se descritos na tabela 5.

Tabela 3. Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas para a realização deste estudo

Linhagens	Genótipo	Fonte
EH3846-4A	<i>Mata ade2-1 lys1-1 his3 ura3-52 leu 2-3 112 trp 1 pso2-11</i>	Dr. M. Brendel, University Frankfurt, Alemanha
YPH98	<i>Mata ade2-101 leu2-Δ1 lys2-801</i>	Henriques e Moustacchi, 1980
CL100	YPH98, pVT103-U	Este estudo
CL101	YPH98, pVT103-U:: <i>uvrB</i>	Este estudo
CL102	YPH98, pVT103-U:: <i>uvrC</i>	Este estudo
CL200	EH3846-4A, pVT103-U	Este estudo
CL201	EH3846-4A, pVT103-U:: <i>uvrB</i>	Este estudo
CL202	EH3846-4A, pVT103-U:: <i>uvrC</i>	Este estudo

Tabela 4. Linhagens de *E. coli* utilizadas para a realização deste estudo

Linhagens	Genótipo	Fonte
DH5 α	<i>F'</i> / <i>endA</i> ₁ <i>hsdR</i> 17(<i>rk</i> ⁻ <i>mk</i> ⁺) <i>supE</i> 44 <i>thi</i> -1 <i>recA</i> 1 <i>gyrA</i> (<i>Nal</i> ^r) <i>relA</i> 1 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169</i> ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15).	Invitrogen
TOP10	<i>F</i> ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMs-mcrBC</i> 80) <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX</i> 74 <i>deoR</i> <i>recA</i> 1 <i>araD</i> 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA</i> 1 <i>nupG</i>	Invitrogen

Tabela 5. Vetores de uso em *S. cerevisiae* e *E. coli*

Plasmídeo	Características	Fonte
pVT103-U	Vetor de uso em <i>S. cerevisiae</i> contendo <i>URA3</i> como marcador genético	Brozmanova, 2001
pZErO ^R -2	Vetor utilizado para clonagem de extremidades cegas	Invitrogen

3.2. MEIOS DE CULTURA

Todos os reagentes utilizados para a formulação dos meios de cultura foram obtidos das empresas Sigma, Synth e Difco. Para o crescimento das células de levedura foi utilizado meio mínimo (MM) ou meio sintético completo (SC) composto de 0,34% de bases nitrogenadas de leveduras, sem aminoácidos, 0,5% de sulfato de amônio, 2% de glicose e 2% de bacto agar. Na lavagem, suspensão e diluição das células foi empregada solução salina (NaCl 0,9%). Também foi utilizado o meio líquido completo (YEPD), cuja constituição é 1% de extrato de levedura, 2% de bacto peptona e 2% de glicose.

Na determinação das marcas auxotróficas, as células de levedura foram semeadas em SC suplementado com os aminoácidos e bases nitrogenadas requeridas, exceto aquelas necessárias para determinar a marca auxotrófica, nas seguintes concentrações: 20 mg.L⁻¹ de hemissulfato de adenina, 10 mg.L⁻¹ de L-histidina, 30 mg.L⁻¹ de L-leucina, 30 mg.L⁻¹ de

L-lisina, 20 mg.Ll⁻¹ de uracil. Assim, para determinar se uma linhagem era auxotrófica para lisina, por exemplo, suas células eram semeadas em SC contendo todos os nutrientes citados, menos lisina. Esse meio passa então a ser denominado meio seletivo ou de omissão.

Para o crescimento das linhagens bacterianas, utilizou-se o meio LB, composto de 1% de extrato de levedura, 0,5% de cloreto de sódio e 2% de bacto triptona, com pH ajustado para 7,0 com NaOH 1 M e, quando necessário, solidificado com 2% de bacto ágar. Para a seleção de colônias de bactérias transformantes e para a manutenção de plasmídeos foi acrescentado o antibiótico ampicilina (100 µg.mL⁻¹) e ou canamicina (50 µg.mL⁻¹) ao meio LB (LB+Amp e LB+Can) respectivamente, dependendo do plasmídeo empregado.

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

3.3. AGENTES QUÍMICOS

A furocumarina monofuncional 3-carbetoxipsoraleno (3-CPs) foi gentilmente fornecida pelo Dr. E. Bisagni (Institut Curie, Orsay, França), e a furocumarina bifuncional 8-metoxipsoraleno (8-MOP) foi obtida da Sigma. As soluções estoque foram preparadas segundo Averbek e Moustacchi (1975): após dissolução de 6,4 mg de 3-CPs ou 5,2 mg de 8-MOP em 4 mL de etanol absoluto (Synth), completou-se o volume com água destilada até 10 mL. As soluções foram armazenadas a 4°C ao abrigo da luz. A concentração final das furocumarinas nas suspensões de células tratadas é 5x10⁻⁵ M.

3.4. ESTOQUE DAS CULTURAS

As culturas de leveduras crescidas em meio seletivo durante 12-15 horas, ou até a concentração celular de 10⁷ células.mL⁻¹, foram diluídas 1:1 em tampão salina contendo 50% de glicerol, e armazenadas em freezer a -20°C ou a -85°C.

As culturas de bactéria foram crescidas por 15 horas em meio LB com e sem antibiótico, diluídas 1:1 em solução de glicerol (65% glicerol, 0,1 M MgSO, 0,025 M Tris-HCL pH 8,0) e armazenadas em freezer a -20°C.

3.5. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Para obtenção de culturas líquidas de células de levedura em fase estacionária de crescimento, alíquotas da placa estoque foram inoculadas em meio seletivo e incubadas a 28 °C com agitação orbital de 180 rpm por 3 dias, ou até atingirem a concentração de 2 a 4×10^8 cels.mL⁻¹, característica de uma fase estacionária. As células em fase exponencial de crescimento foram obtidas com 12-15 horas de incubação a 28 °C com agitação orbital de 180 rpm, atingindo 1 a 2×10^7 células.mL⁻¹ e cerca de 20 a 30% de células em brotos.

3.6. TESTE EM GOTAS QUALITATIVO

Na determinação de marcas de auxotrofia, gotas com 5-10 µL de suspensões celulares em tampão salina contendo 10^5 a 10^7 cels.mL⁻¹ foram depositadas em placas de Petry contendo meio MM ou meios de omissão. Após 3-4 dias de crescimento a 28 °C, as células aptas a formar colônias nos meios de omissão eram consideradas prototróficas para os respectivos aminoácidos omitidos, e aquelas que não formavam colônias eram consideradas auxotróficas. Também para caracterizar rapidamente um grande número de transformantes quanto à sensibilidade a diversos agentes mutagênicos foi utilizado o teste em gotas.

Para o ensaio de teste em gotas com 8-MOP + UVA e 3-CPs + UVA, uma suspensão celular foi tratada com 5×10^{-5} M de 8-MOP e 3-CPs, e incubada por 15 minutos a 4 °C no escuro. Após o depósito das gotas como descrito neste item, as placas foram irradiadas com 3 e 6 kJ. m⁻² de UVA para o teste com 3-CPs, e 2 e 3 kJ. m⁻² para 8-MOP.

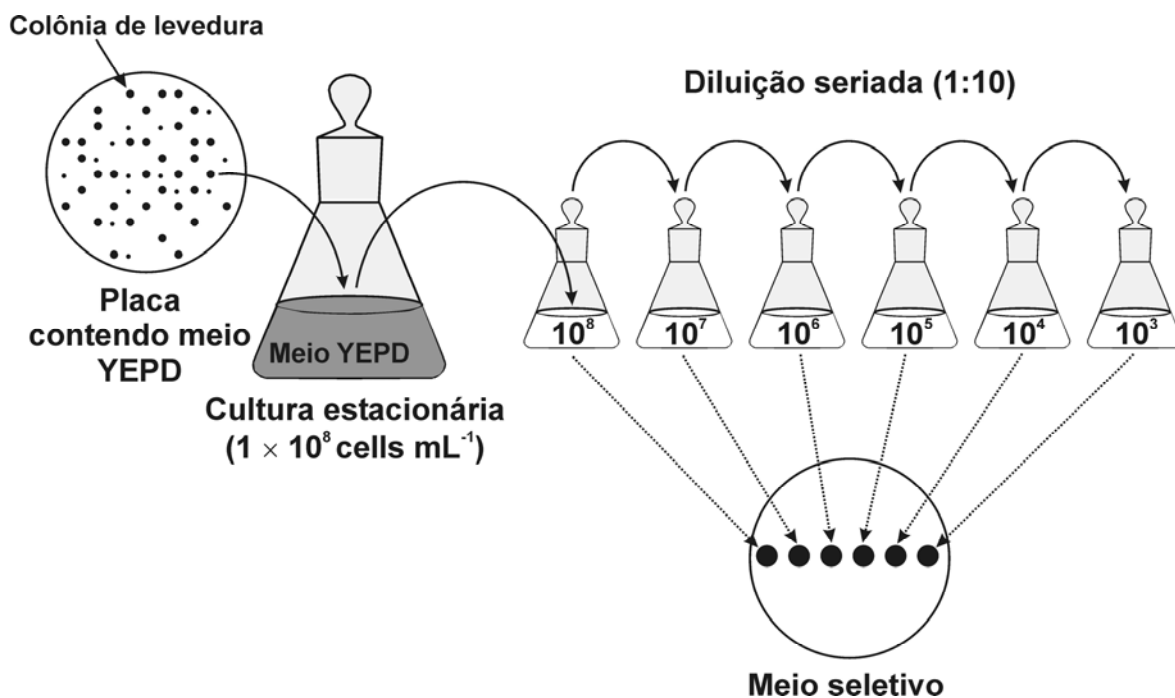


FIGURA 4. Esquema demonstrativo do funcionamento de um teste em gotas.

3.7. CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA

3.7.1. Preparação das suspensões celulares

As culturas de células em fase estacionária de crescimento foram centrifugadas a 5000 x g por 5 min a 4 °C e lavadas com salina por 3 vezes para a completa remoção do meio de cultura. Para dissociar eventuais agrupamentos celulares, as suspensões celulares foram submetidas a tratamento com ultrassom (Ultrasonic Homogenizer 4710, Cole-Palmer Instrument) por 10 a 30 segundos. A concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer e ajustada para 2×10^6 céls.mL⁻¹.

3.7.2. Tratamento com 3-CPs e 8-MOP + UVA

Para os tratamentos com 3-CPs e 8-MOP, as suspensões celulares em fase estacionária de crescimento foram incubadas a 4 °C por 15 min ao abrigo da luz com concentrações eqüimoleculares de 5×10^{-5} M de 3-CPs ou 8-MOP (ver item 2.3). Após incubação, retirou-se uma alíquota para controle, e diluições apropriadas foram feitas e semeadas em SC-Ura. Alíquotas de 10 mL foram expostas a doses crescentes de radiação UVA em placas de Petry

de plástico abertas. Alíquotas foram retiradas a cada dose, diluídas apropriadamente, semeadas em triplicata em placas de SC-Ura e incubadas a 28 °C por quatro dias. Após este período, a contagem do número de colônias visíveis em cada placa foi realizada e, com base nas diluições efetuadas, calculou-se a fração de sobrevivência de cada linhagem em relação à dose zero. A dose de radiação ao nível da preparação celular foi de 1,1 kJ.m⁻², conforme estabelecido por um dosímetro Black-Ray® J221 (Ultraviolet Products Inc.). Para irradiação foi utilizado o aparelho Stratalinker^R 1800 (Stratagene).

3.7.3. Tratamento com radiação UVC

As alíquotas de 10 mL das suspensões de 2x10⁶ cels.mL⁻¹ em fase estacionária de crescimento foram submetidas à irradiação com doses crescentes de UVC. A cada dose, uma alíquota foi retirada, diluída e semeada em SC-Ura, em triplicata. As placas foram incubadas a 28 °C, durante 3 dias e as colônias visíveis foram contadas, as diluições foram corrigidas e convertidas em taxa de sobrevivência com relação ao controle. A taxa de dose de UVC, ao nível da preparação celular, foi de 10 J m⁻², conforme determinado por um dosímetro Black-Ray J225 (Ultraviolet Products Inc).

3.8. DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE REVERTENTES HIS⁺ E DE MUTAÇÃO PARA FRENTE OU “FORWARD MUTATION”

Para a determinação da frequência de mutações reversas, alíquotas de 0,3 mL de uma suspensão celular contendo 1x10⁹ céls. mL⁻¹ foram incubadas com 8-MOP + UVA conforme descrito nas curvas de sobrevivência. A seguir, as células foram semeadas em placas de Petry contendo meio sintético com omissão de arginina e acrescentado de canavanina a 60 µg.mL⁻¹. Após a semeadura, as placas foram irradiadas com diferentes doses de UVA, e incubadas a 28 °C no escuro por 3 a 5 dias, sendo o experimento realizado em triplicata. As colônias mutantes foram contadas e calculou-se a taxa de reversão. A sobrevivência foi monitorada paralelamente.

3.9. MÉTODOS RELACIONADOS A ÁCIDOS NUCLÉICOS

A preparação de soluções e tampões foi feita segundo a metodologia empregada em laboratórios de Biologia Molecular, descritas por Ausubel *et al.*, (1995) e Sambrook *et al.*,

(1989). Os produtos químicos foram obtidos da Sigma, Merck, Fluka-Biochemika, Difco e Gibco BRL.

As enzimas de restrição e os respectivos tampões usados nas técnicas de genética molecular foram obtidos da Pharmacia, MBI e Invitrogen.

3.9.1. Extração de DNA genômico

Para posterior amplificação por PCR dos genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* de *E. coli* realizou-se a extração do DNA genômico de uma linhagem selvagem de *E. coli* (DH5 α), com o reagente Easy-DNA™ Kit (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade da extração foi analisada por migração eletroforética em gel de agarose.

3.9.2. Amplificação do fragmento de interesse pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os genes *uvrA* (gi/148164/), *uvrB* (gi/43283/) e *uvrC* (gi43287/) de *E. coli* foram amplificados com a enzima Pfx DNA polimerase (Invitrogen), que possui atividade de correção 3'→ 5'. A partir da seqüência dos genes presente em banco de dados, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores com a inserção dos sitios de restrição para as endonucleases *SacI* e *PstI*, para a clonagem no vetor de expressão em levedura.

Os primers específicos utilizados para amplificação dos genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* a partir do DNA genômico de *E. coli* DH5 α foram os seguintes:

uvrA 5' GAG CTC GAA AGG TGA ATG GAT AAG ATC GAA G 3"
5' CTG CAG GAT TAC AGC ATC GGC TTA AGG AAG C 3"

uvrB 5' GAG CTC GCG ACT CAT GAG TAA ACC GTT CAA A 3"
5' CTG CAG CCT GTT ACG ATG CCG CGA TAA ACA G 3"

uvrC 5' GAG CTC TTA TCG CAT GTA CGA TGC TGG TGG T 3"
5' CTG CAG GAG ACA TCA ATG TTT CAA CGA CCA G 3"

GAG CTC sítio para *SacI* e
CTG CAG sítio para *PstI*

FIGURA 5. Primers específicos utilizados para amplificação dos genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* de *E. coli* a partir do DNA genômico.

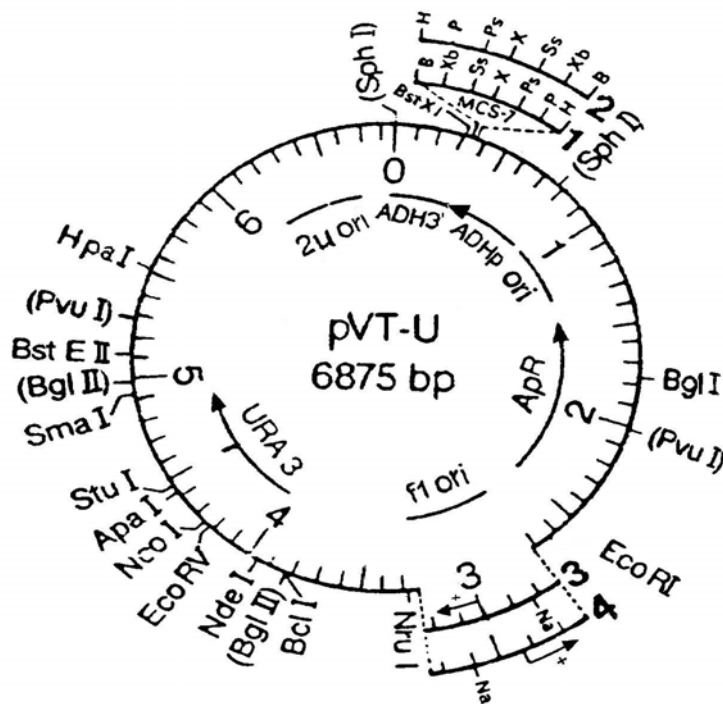


FIGURA 6. Mapa do Vetor de Expressão pVT103-U utilizado para o clonagem dos genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* de *E. coli*. O vetor contém uma origem de replicação para levedura (2μ ori); um promotor forte, de expressão constitutiva (*ADH1*), isolado do gene *ADH1* de *S. cerevisiae*; gene de resistência a ampicilina (Ap^R); e o gene *URA3* como marca prototrófica.

As misturas de reações continham 10 U de *Pfx* DNA polimerase, 0,4 μ M de oligonucleotídeo iniciador, 1 μ L de DNA genômico de *E. coli* DH5 α , 0,25 μ M de cada dNTP, e 10 μ L de tampão de reação da enzima 10x (Invitrogen) em um volume final de 100 μ L. As condições utilizadas para amplificação dos genes *uvrA* foram: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos (1 ciclo); desnaturação 95 °C por 30 segundos; anelamento a 48 °C por 30 segundos, 30 ciclos; extensão a 72 °C por 15 minutos (1 ciclo). Para o gene *uvrB* as condições foram as seguintes: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos (1 ciclo); desnaturação 95°C por 30 segundos; anelamento a 49,5 °C por 30 segundos, 30 ciclos;

extensão a 72 °C por 15 minutos (1 ciclo). Para amplificação do gene *uvrC*, a única modificação as demais condições acima foi a temperatura de anelamento de 48,5°C. Os produtos de PCR foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% com 0,01 % de brometo de etídeo e visualizados com iluminação ultravioleta. Os fragmentos de interesse foram purificados para ligação no vetor pZErO^R-2 (Invitrogen), para posterior subclonagem no vetor de expressão em levedura pVT103-U.

3.10. CLONAGEM DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS NO VETOR pZErO^R-2

3.10.1. Purificação dos fragmentos amplificados

Após a amplificação e separação dos fragmentos de interesse por meio de eletroforese, *uvrA* (~2,6 kb), *uvrB* (~2,1 kb), *uvrC* (~1,8 kb), realizou-se a extração do DNA do gel de agarose 1% utilizando o reagente Concert Matrix Gel Extraction KIT^R (GIBCO). O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm.

3.10.2. Ligação do fragmento amplificado no vetor pZErO^R-2

A ligação do fragmento de DNA amplificado no vetor pZErO^R-2 (figura 7) clivado com a enzima *EcoRV*, foi realizada com a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen), utilizando-se o tampão próprio desta. Incubou-se a reação a 16 °C por 1 hora.

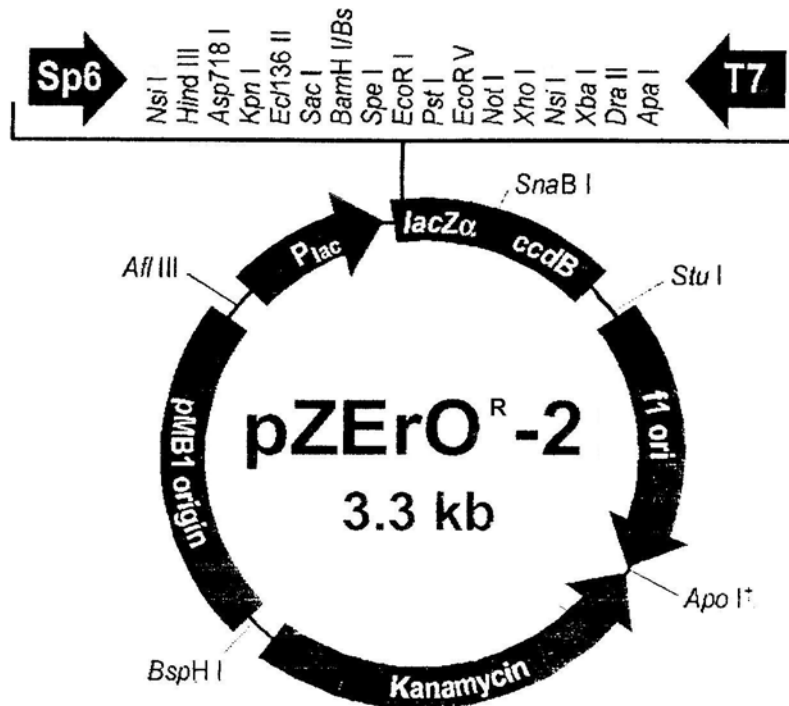


FIGURA 7. Mapa do vetor de clonagem pZEROR-2 (Invitrogen), utilizado para o clonagem dos produtos de PCR de 2,6 kb, 2,1 kb, e 1,8 kb correspondentes aos genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* de *E. coli*. Este vetor contém os seguintes elementos: um promotor Plac, que controla a expressão do gene fusionado *lacZα-ccdB*; o gene *ccdB* que codifica para uma proteína letal; uma origem de replicação f1 ori que permite a replicação em alto número de cópias e a manutenção do plasmídeo em *E. coli*. A ligação do fragmento resultante da PCR com extremidades cegas interrompe a expressão do gene fusionado *lacZα-ccdB*, permitindo o crescimento de quase 100 % dos recombinantes positivos após a transformação destes. Kanamycin: ORF de resistência à canamicina.

3.10.3. Preparação de células cálcio competentes de *E. coli* DH5α

Inoculou-se em 5 mL de LB líquido células da bactéria *E. coli* DH5α por 20 horas com agitação de 180 rpm. Transferiu-se 2 mL deste inóculo inicial para um frasco Erlenmeyer contendo 100 mL de LB líquido e incubou-se a 37 °C sob agitação de 200 rpm por aproximadamente 3 horas. As células foram centrifugadas a 3000 x g a 4 °C por 10 minutos. O precipitado de células foi ressuspenso em 10 mL de CaCl₂ 0,1 M, e centrifugou-se novamente a 3000 x g a 4 °C por 10 minutos. Ressuspendeu-se o precipitado de células em 2 mL de CaCl₂ 0,1 M. Transferiu-se 200 µL da suspensão para tubos de microcentrífuga.

As alíquotas foram armazenadas à -80 °C. (Sambrook *et al.*, 1989).

3.10.4. Transformação de células cálcio competentes de *E. coli* DH5 α com o plasmídeo pZErO^R-2

As amostras de células competentes armazenadas a -80 °C foram descongeladas, sendo 100 μ L adicionados a 5 μ L da reação de ligação e incubadas no gelo por 5 minutos. Em seguida, procedeu-se incubação por 2 minutos em banho-maria a 42 °C, retornando ao gelo. Adicionou-se 1 mL de LB líquido, misturou-se, e as amostras foram incubadas por 1 hora a 37 °C sob agitação. Em placas de LB+Can , plaqueou-se 100 μ L da transformação, sendo as placas incubadas a 37 °C por 18 horas.

3.10.5. Seleção dos recombinantes

Após 18 horas de incubação a 37 °C, algumas colônias foram isoladas, e colocadas para crescer em meio LB+Can por 16 horas a 37 °C sob agitação, para extração do DNA plasmideal pelo método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Para a confirmação de que a ligação dos fragmentos purificados no vetor estava na orientação correta, clivou-se 3 μ L da preparação plasmideal com as enzimas de restrição *SacI* e *PstI*. O tamanho dos fragmentos clivados foi observado em eletroforese em gel de agarose 1%.

3.11. SUBCLONAGEM DOS GENES *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* NO VETOR pVT103-U DE EXPRESSÃO EM LEVEDURA

Os fragmentos correspondentes aos genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* foram purificados do gel de agarose utilizando-se reagente Concert Matrix Gel Extraction KIT^R (GIBCO). Para a reação de ligação no vetor pVT103-U foram utilizados 6 μ L do inserto purificado (15 ng/ μ L), 1 μ L do vetor linearizado com as enzimas *SacI* e *PstI*, 2 μ L da enzima T4 DNA Ligase, e 2 μ L de tampão da enzima.

3.11.1. Transformação de células cálcio competentes de *E. coli* DH5 α com o plasmídeo pVT103-U

As amostras de células competentes armazenadas à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram descongeladas, sendo $100\text{ }\mu\text{L}$ adicionados a $5\text{ }\mu\text{L}$ da reação de ligação e incubadas no gelo por 5 minutos. Em seguida, procedeu-se incubação por 2 minutos em banho-maria a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, retornando ao gelo. Adicionou-se 1 mL de LB líquido, misturou-se, e as amostras foram incubadas por 1 hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação. Em placas de LB+Amp foram plaqueados $100\text{ }\mu\text{L}$ da transformação, sendo as placas armazenadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 horas.

3.11.2. Seleção do recombinantes

Após 20 horas de incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ algumas colônias isoladas foram colocadas para crescer em meio LB+Amp por 18 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação, para extração do DNA plasmideal pelo método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Com objetivo de se confirmar a orientação correta dos fragmentos, clivou-se $3\text{ }\mu\text{L}$ da preparação plasmideal com as endonucleases de restrição *SacI* e *PstI*. Não foi possível nesta etapa a subclonagem do gene *uvrA*. O tamanho dos fragmentos foi observado em eletroforese em gel de agarose 1%.

3.11.3. Transformação de células de *S. cerevisiae* com o vetor de expressão

Utilizou-se o método de acetato de lítio (Gietz *et al.*, 1992) para transformação das linhagens de levedura com os plasmídeos vazios, e contendo os genes *uvrB* e *uvrC*. As células de levedura crescidas em meio SC-Ura a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 horas até fase exponencial tardia (contendo $2\text{ a }6 \times 10^7\text{ cels.mL}^{-1}$) e foram centrifugadas a $5000 \times g$ por 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo as células ressuspensas em 1 mL de acetato de lítio $0,1\text{ M}$. A suspensão foi transferida para tubos de microcentrífuga e centrifugada por 5 segundos a $12000 \times g$. O sobrenadante foi aspirado, e o sedimento ressuspenso em aproximadamente 1 mL de acetato de lítio $0,1\text{ M}$. A suspensão foi dividida em tubos de microcentrífuga, cada um com $50\text{ }\mu\text{L}$. Nestes $50\text{ }\mu\text{L}$ foram adicionados $240\text{ }\mu\text{L}$ de PEG 50%, $36\text{ }\mu\text{L}$ de acetato de lítio 1 M , $20\text{ }\mu\text{L}$ de SS-DNA (2 mg.mL^{-1}), $3\text{ }\mu\text{L}$ de DNA plasmideal. A suspensão foi incubada a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos, e logo após foi aplicado o choque térmico de $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 a 25 minutos. A mistura foi centrifugada a $12000 \times g$ por 5 segundos, e o sedimento gentilmente ressuspenso em $200\text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura estéril. A suspensão celular foi plaqueada em meio SC-Ura, sendo as colônias transformantes analisadas após 4 dias de crescimento a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.12. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

3.12.1. Preparação do fenol ácido

O protocolo do fenol ácido foi preparado de acordo com Kirby *et al.*, (1964). Para tanto se usou 500 gramas de fenol sólido, incolor e destilado, 70 mL de m-cresol incolor, 0,5% de 8-hidroxiquinolina e 55 mL de água destilada.

Os 500 gramas de fenol foram liquefeitos a 65 °C em um banho de água. Separadamente, em um béquer fornado de um litro, adicionou-se o *m*-cresol e 8-hidroxiquinolina. Com agitação lenta foram adicionados, aos poucos, 500g de fenol liquefeito. A solução foi agitada por 10 minutos e a seguir adicionou-se água. Quando a temperatura da solução baixou para a temperatura ambiente, acondicionou-se esta em um frasco escuro de boca larga e guardou-se sob refrigeração a 4 °C durante um prazo máximo de um mês.

3.12.2. Extração de RNA de leveduras

As células de levedura foram crescidas em um volume 5-10 mL de SC-Ura até atingirem a fase exponencial de 2×10^7 células/mL (aproximadamente 4 horas) e foram centrifugadas a 5.000 x *g* por 5 minutos. O precipitado celular foi ressuscitado em 0,85 mL de Solução de Spencer (50 mM de Tris-Cl pH 8,0, 1 mM de EDTA e 2% de N-lauroilsarcosinato, e transferido para um tubo de microcentrífuga contendo 0,85 mL de fenol ácido. Foi adicionado acetato de sódio 3 M até atingir uma concentração final de 50 mM, incubando-se com agitação ocasional por uma hora a 65 °C. A solução foi colocada no gelo por 10 minutos e após centrifugada a 10.000 x *g* por 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo de microcentrífuga contendo 0,85 mL de clorofórmio com o objetivo de separar as fases aquosas e orgânicas . Agitou-se bem , e em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 x *g* por 10 minutos. A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um tubo de microcentrífuga contendo 1,7 mL de etanol absoluto, deixando-se incubar à -20 °C durante 30 minutos. A amostra foi centrifugada a 10.000 x *g* por 10 minutos e deixada secar. O material foi lavado com etanol 75% e ressuscitado em 0,1 mL de formamida. A qualidade da extração foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 1%.

3.12.3 Análise da expressão gênica utilizando a técnica da transcrição reversa associada a PCR (RT-PCR)

Retirou-se 30 µL da amostra de RNA total e submeteu-se a purificação com sucessivas lavagens com etanol 70%, objetivando-se eliminar qualquer resíduo de formamida, um inibidor da reação de RT-PCR. Antes da realização do RT-PCR, as amostras foram incubadas 15 minutos a 65 °C com DNase I. Para a produção de cDNA, utilizou-se 1,5 µL do RNA total purificado ressuspendido em água estéril, 0,4 µL de oligonucleotídeo (2 mmol), 1 µL de DTT (0,1 M – Invitrogen), 4 µL de tampão de primeira fita 5X (Invitrogen), 1 µL da mistura de dNTP (10 mM), 1 µL da enzima Superscript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (200 U/ µL). As condições de reação foram as seguintes: 25 °C por 5 minutos, 55 °C por 60 minutos e 70 °C por 15 minutos. Após incubar as reações a 37 °C por 20 minutos com 0,5 µL RNase H (2U/ µL – Invitrogen), a primeira fita de cDNA produzida foi submetida a PCR, com os pares de primers internos para os genes *uvrC* e *uvrB* como descrito no item 2.9.2. Os produtos das reações foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5 %.

4. RESULTADOS

Com o objetivo de testar os fenótipos de sensibilidade do mutante *pso2-1* de *S. cerevisiae* transformado com os genes *uvrB* e *uvrC* de *E. coli*, os mesmos foram amplificados por PCR, realizou-se a ligação no vetor pZErO^R-2, e a subclonagem no plasmídeo de expressão em levedura pVT103-U.

4.1. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* de *E. coli* DH5 α UTILIZANDO A TÉCNICA DE PCR

Os genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* foram amplificados a partir do DNA genômico de uma linhagem selvagem de *E. coli* DH5 α , com emprego da enzima *Pfx* DNA polimerase, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos. Sítios de reconhecimento para as endonucleases de restrição *SacI* “forward primers” e *PstI* “reverse primers”, foram incluídos na construção dos oligonucleotídeos, conforme o esquema apresentado na Figura 5. Posteriormente, estes sítios de restrição foram utilizados para a clonagem dos genes *uvrB* e *uvrC* no vetor de expressão em levedura pVT103-U. Diversas PCRs foram feitas empregando-se a enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), para fins de se otimizar a amplificação do fragmento com o uso de diferentes temperaturas de anelamento, tempos de extensão e concentração de alguns reagentes. Somente após a reação estar padronizada, com os fragmentos obtidos no tamanho correto, utilizou-se a enzima *Pfx* DNA polimerase, devido a sua atividade de correção 3' \rightarrow 5'. Os produtos de PCR correspondente aos genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC*, separados em gel de agarose, podem ser visualizados nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

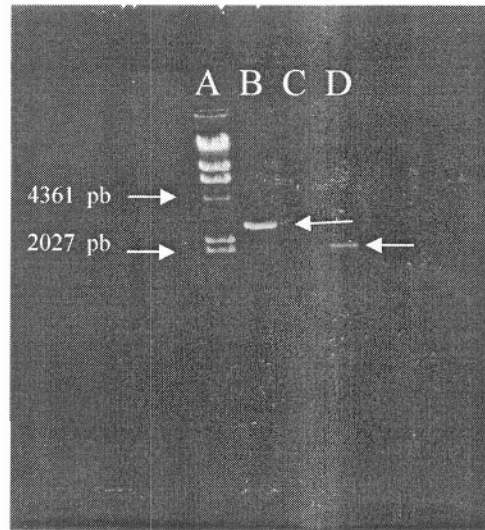


Figura 8. Amplificação por PCR dos fragmentos correspondentes a seqüência dos genes *uvrA*, e *uvrB* de *E. coli* DH5 α . A análise dos produtos de PCR foi realizada em eletroforese em gel de agarose 0,8 % e 0,5 μ g/mL de brometo de etídeo. Coluna A: marcador de peso molecular λ DNA/*Hind*III (Invitrogen), coluna B: produto de PCR correspondente ao gene *uvrA*, coluna C: controle negativo (mistura da reação), coluna D: fragmento correspondente ao gene *uvrB*.

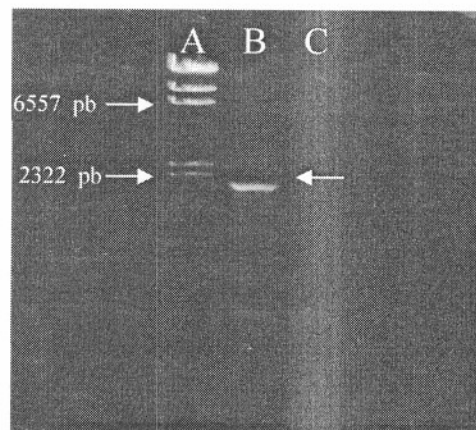


Figura 9. Amplificação por PCR do fragmento correspondente a seqüência do gene *uvrC* de *E. coli* DH5 α . A análise dos produtos de PCR foi realizada em eletroforese em gel de agarose 0,8 % e 0,5 μ g/ml de brometo de etídeo. Coluna A: marcador de peso molecular λ DNA/*Hind*III, coluna B: produto de PCR correspondente ao gene *uvrC*, coluna C: controle negativo (mistura da reação).

4.2. CLONAGEM DOS FRAGMENTOS *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* NO VETOR PLASMIDEAL pZErO^R-2

2

A sistemática utilizada pelo vetor pZErO^R-2, conhecida como seleção positiva, permite seleção direta dos recombinantes, visto que os fragmentos de DNA são ligados no vetor já previamente linearizado em um local que causa a interrupção da expressão de um gene letal, *ccdB* (Figura 7). Este gene é naturalmente encontrado no locus *ccd*, “control of cell death”, do plasmídeo F. A proteína CcdB age inibindo a DNA girase bacteriana (topoisomerase II), uma enzima que catalisa o super-enrolamento negativo do DNA, de uma forma ATP-dependente (Bernard *et al.*, 1993). Deste modo, após a transformação da célula hospedeira, somente os recombinantes que receberam o inserto (recombinantes positivos) podem crescer. As células contendo vetores que não receberam o inserto perdem a viabilidade quando semeadas, visto que a proteína CcdB é expressa. Mesmo com esse sistema de seleção, ocorreram casos de falso-positivos em algumas amostras testadas. O resultado da triagem dos clones recombinantes para os genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* está apresentado nas Figuras 10 e 11, respectivamente.



Figura 10. Triagem dos clones recombinantes (plasmídeo pZErO^R-2 contendo os insertos de 2.600 pb e 1.800 pb, correspondentes aos genes *uvrA* e *uvrC*, respectivamente). Os DNAs plasmideais foram

digeridos com as enzimas *SacI* e *PstI* e analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8 % e 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. Coluna A: marcador de peso molecular λ DNA/*HindIII*, coluna E: clone que apresenta o inserto *uvrA*, colunas L e M: clones que apresentam o inserto correspondente ao gene *uvrC*.

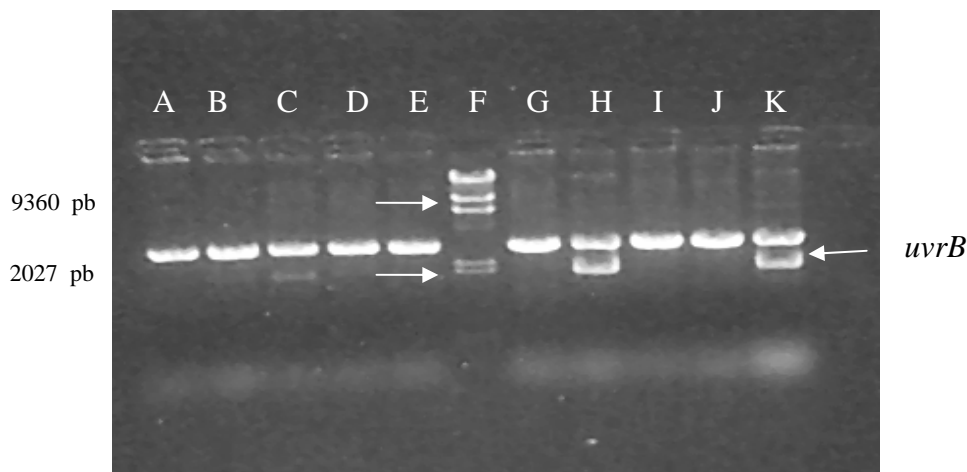


Figura 11. Triagem dos clones recombinantes (plasmídeo pZErO^R-2 contendo o inserto de 2.100 pb, correspondente ao gene *uvrB*). Os DNAs plasmideais foram digeridos com a enzima *SacI* e *PstI* e analisados por eletroforese em gel de agarose 1 % e 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. Coluna F: marcador de peso molecular λ DNA/*HindIII*, coluna C,H,K: clones que apresentam o inserto de 2.100 pb representativo do gene *uvrB*.

4.3. SUBCLONAGEM DOS GENES *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* NO VETOR DE EXPRESSÃO EM *S. cerevisiae* pVT103-U

Com a construção dos oligonucleotídeos iniciadores contendo sítios de reconhecimento para as enzimas *SacI* e *PstI* para os três genes *uvr*, clivou-se o vetor pZErO^R-2 com as respectivas enzimas, liberando os fragmentos correspondentes aos genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC*. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com o reagente Concert Matrix Gel Extraction KIT^R (GIBCO). Após a purificação, foi realizada a ligação no vetor de expressão pVT103-U, transformou-se em células de *E. coli* DH5α cálcio competentes, sendo a seleção dos recombinantes feita em meio LB + Amp. A confirmação de que os insertos estavam na posição correta foi feita clivando-se o vetor pVT103-U com as enzimas de restrição *SacI* e *PstI*. Devido a problemas durante a etapa de ligação no vetor de expressão não foi possível a clonagem do gene *uvrA*. Os plasmídeos de expressão, contendo os insertos no tamanho e posição corretas, bem como o plasmídeo vazio, foram transformados em células de levedura (linhagem selvagem e

mutante) com o método de acetato de lítio (Gietz *et al.*, 1992) para a realização das comparações fenotípicas. A clonagem dos genes *uvrC* e *uvrB* no vetor de expressão está mostrada nas figuras 12 e 13, respectivamente.

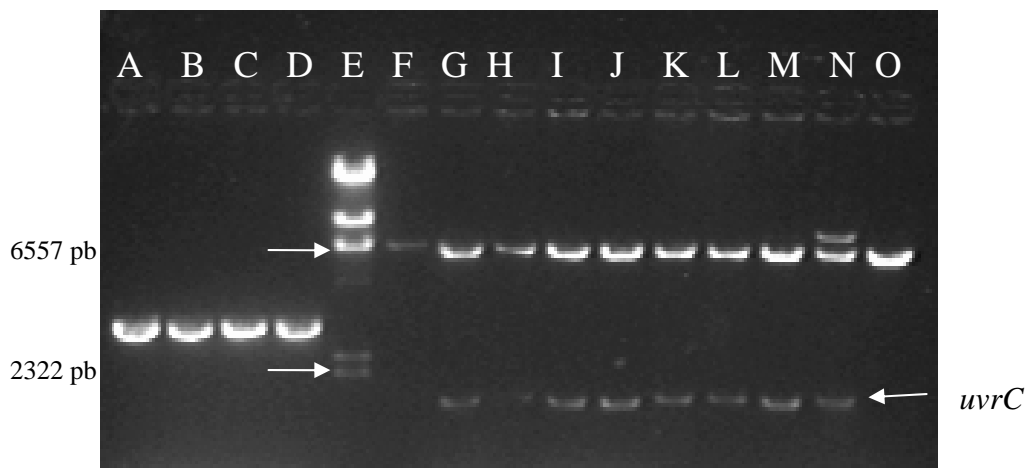


Figura 12. Clivagem do inserto relativo ao gene *uvrC* clonado no plasmídeo pVT103-U. Os DNAs clivados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo. Coluna E: marcador de peso molecular λ DNA/*Hind*III, colunas G, H, I, J, K, L, M, N, O: DNA plasmídeo (pVT103-U::*uvrC*) clivado com as enzimas *Sac*I e *Pst*I.

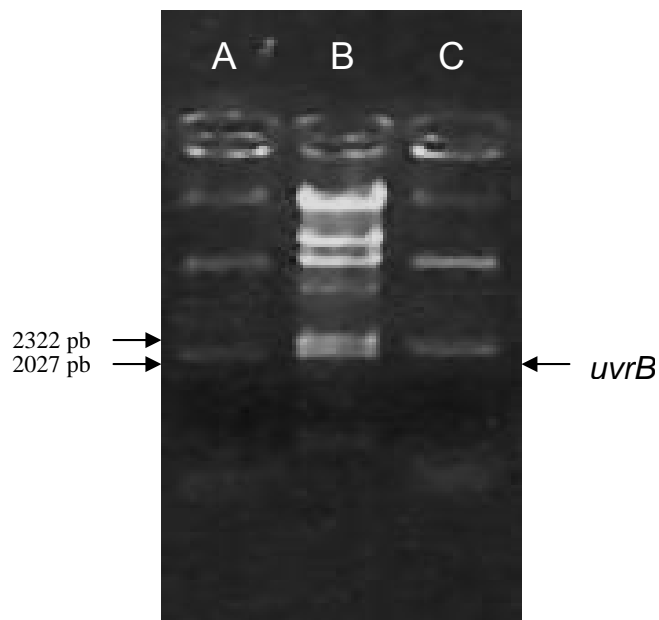


Figura 13. Clivagem do inserto relativo ao gene *uvrB* clonado no plasmídeo pVT103-U. Os DNAs clivados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/mL de brometo de

etídeo. Coluna B: marcador de peso molecular λ DNA/*Hind*III, colunas A, C: inserto correspondente ao gene *uvrB*.

4.4. EXPRESSÃO DOS GENES *uvrB* e *uvrC*

A expressão dos genes bacterianos clonados no vetor de levedura sob indução do promotor *ADH1*, foi verificada através de ensaios de RT-PCR. As linhagens de levedura foram crescidas em meio SC-Ura e, após 48 horas de crescimento (fase estacionária), foi feita a extração de RNA total das células. As linhagens analisadas foram as seguintes: CL200, CL201, CL202, e CL100. Os pares de oligonucleotídeos iniciadores foram específicos para os genes (ver materiais e métodos). Somente as linhagens transformadas com os plasmídeos que continham o gene *uvrB* ou *uvrC* clonado, apresentaram amplificação a partir do RNA. Os resultados podem ser vistos na figura 14.

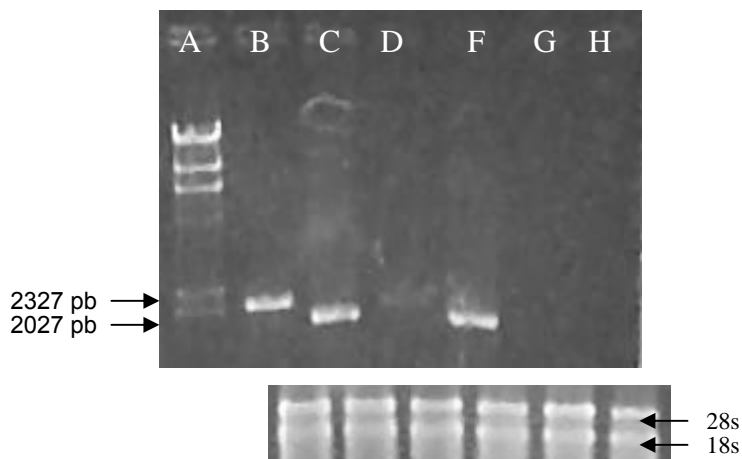


Figura 14. Análise da expressão gênica em levedura por RT-PCR. Painel superior: - Coluna A: marcador de peso molecular λ DNA/*Hind*III, colunas B, D: fragmento correspondente ao gene *uvrB*, colunas C, E: fragmento correspondente ao gene *uvrC*, colunas F, G: amplificação realizada a partir do cDNA obtido das linhagens transformadas com o plasmídeo vazio. Painel inferior: extração de RNA total.

4.5. ANÁLISE FENOTÍPICA DO MUTANTE *ps02-1* de *S. cerevisiae* TRANSFORMADO COM pVT103-U::*uvrB* e pVT103-U::*uvrC*

A sensibilidade do mutante *pso2-1* de *S. cerevisiae* e de sua linhagem selvagem transformados com o plasmídeo de expressão vazio e contendo os genes *uvrB* e *uvrC* isoladamente, foi testada frente a diversos agentes mutagênicos, entre eles, os psoralenos fotoativados, (3-CPs + UVA , 8-MOP + UVA), e ultravioleta curto (UVC), em comparação com a linhagem selvagem *PSO2* e ao próprio mutante *pso2-1*. Realizou-se inicialmente um teste em gotas (ver materiais e métodos), e depois foram feitas curvas de sobrevivência para os agentes acima descritos.

4.5.1. Sensibilidade do mutante *pso2-1* de *S. cerevisiae* e da linhagem selvagem ao efeito letal de diferentes agentes mutagênicos

Para avaliar o comportamento do mutante *pso2-1* de *S. cerevisiae* após inserção dos genes *uvrB* e *uvrC* e do plasmídeo vazio, bem como da linhagem selvagem *PSO2*, diversas colônias submetidas a crescimento até fase estacionária foram expostas ao tratamento 8-MOP + UVA, 3-CPs + UVA e UVC. A sensibilidade das linhagens CL100, CL101, CL102, CL200, CL201, e CL202 frente a estes agentes mutagênicos pode ser visualizada nas figuras 15, 16 e 17.

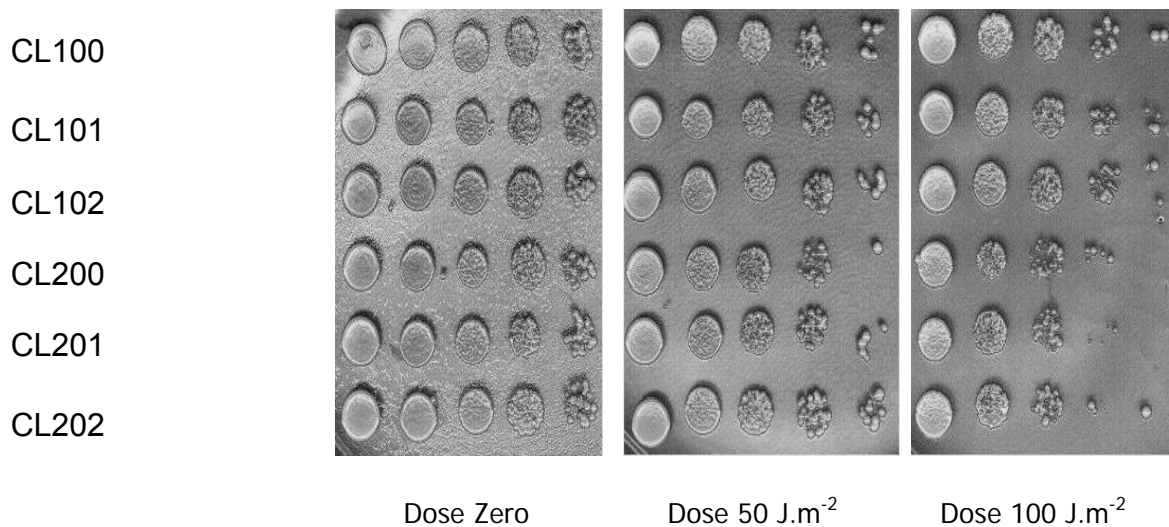


Figura 15. Sensibilidade das diferentes linhagens à UVC. Diluições seriadas (1:10) partindo de uma suspensão celular de 1×10^7 céls.mL⁻¹ tratadas em fase estacionária de crescimento.

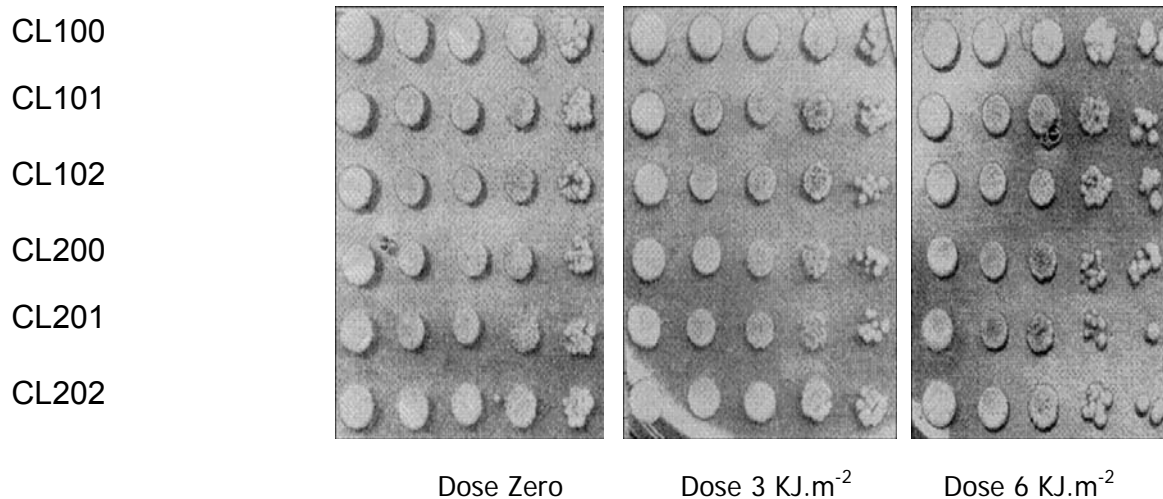


Figura 16. Sensibilidade das diferentes linhagens à 3-CPs + UVA. Diluições seriadas (1:10) partindo de uma suspensão celular de 1×10^7 céls.mL⁻¹ em fase estacionária de crescimento.

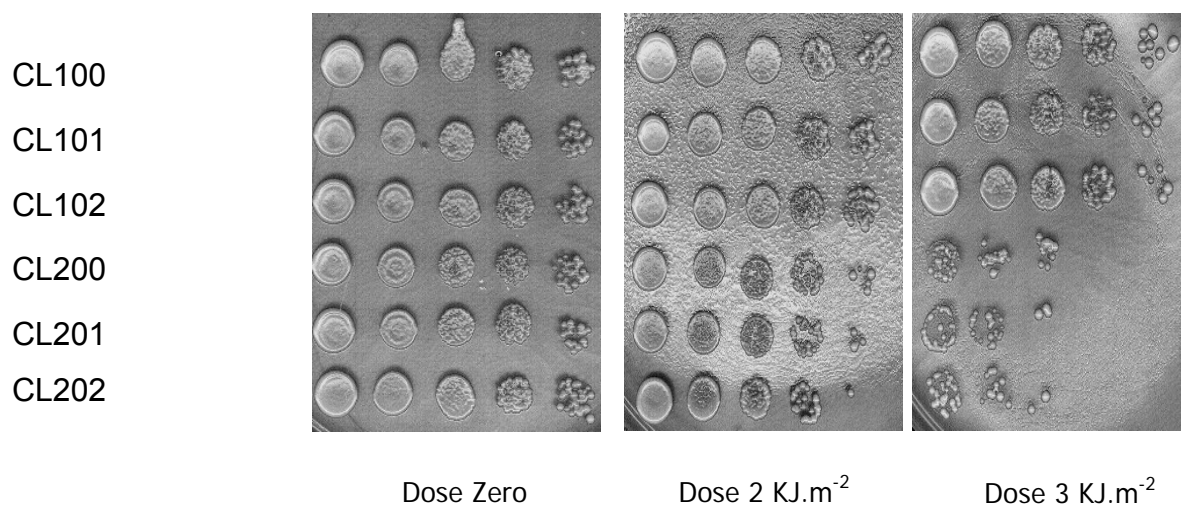


Figura 17. Sensibilidade das diferentes linhagens à 8-MOP + UVA. Diluições seriadas partindo de uma suspensão celular de 1×10^7 céls.mL⁻¹ em fase estacionária de crescimento.

4.5.2. Sobrevivência após a adição de furocumarinas mono (3-CPs + UVA) e bi-funcionais (8-MOP + UVA)

A sensibilidade das linhagens EH3846-4A, CL200, CL201, e CL202, quando comparada à respectiva linhagem YPH98 foi semelhante quando expostas a 3-CPs + UVA e 8-MOP +UVA. Nas figuras 18 e 19, pode-se observar a sensibilidades das linhagens transformadas à exposição aos psoralenos fotoativados.

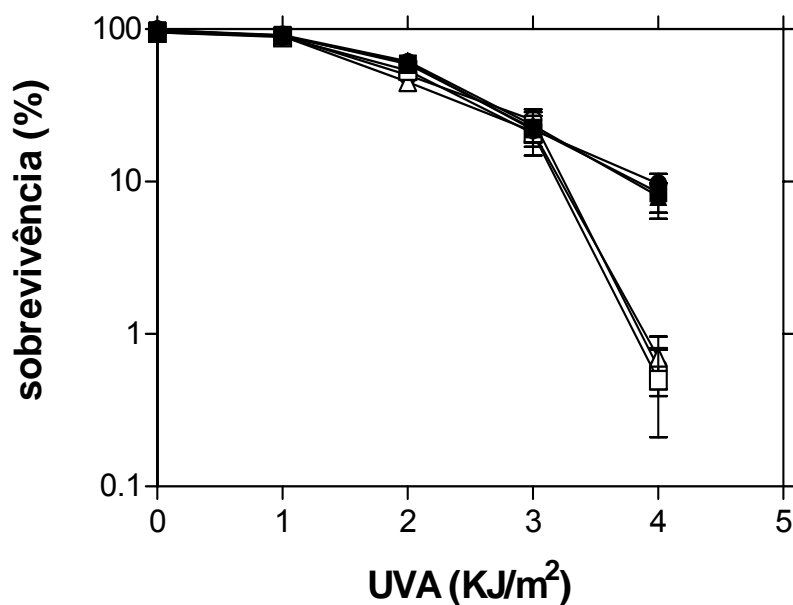


Figura 18. Sobrevivência das linhagens mutante *psb2-1* e selvagem transformadas com o plasmídeo vazio e contendo os genes *uvrB* e *uvrC* após tratamento com 3-CPS fotoativado. CL100 (quadrado preenchido); CL101 (triângulo preenchido); CL102 (círculo preenchido); CL200 (quadrado não preenchido); CL201 (triângulo não preenchido); CL202 (círculo não preenchido). As suspensões celulares foram tratadas em fase estacionária de crescimento.

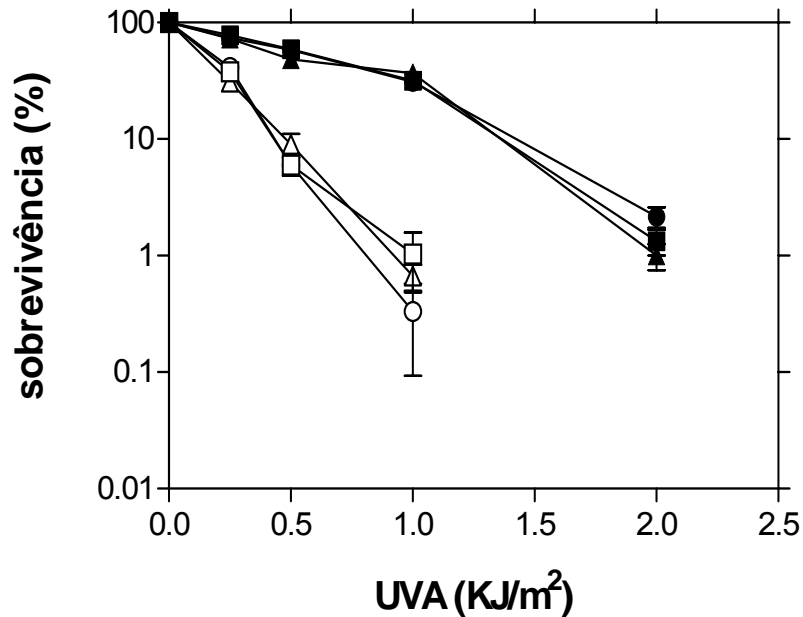


Figura 19. Sobrevivência das linhagens mutante *pso2-1* e selvagem transformadas com o plasmídeo vazio e contendo os genes *uvrB* e *uvrC* após tratamento com 8-MOP fotoativado. CL100 (quadrado preenchido); CL101 (triângulo preenchido); CL102 (círculo preenchido); CL200 (quadrado não preenchido); CL201 (triângulo não preenchido); CL202 (círculo não preenchido). As suspensões celulares foram tratadas em fase estacionária de crescimento.

4.5.3. Sobrevivência após tratamento com radiação UVC

A sensibilidade do mutante *pso2-1* de *S. cerevisiae* difere muito pouco em relação à linhagem selvagem *PSO2* quando exposta à radiação UVC. A figura 20 mostra a curva de sobrevivência das linhagens mutante EH3846-4A e selvagem transformadas com o plasmídeo vazio e contendo os genes *uvrB* e *uvrC*.

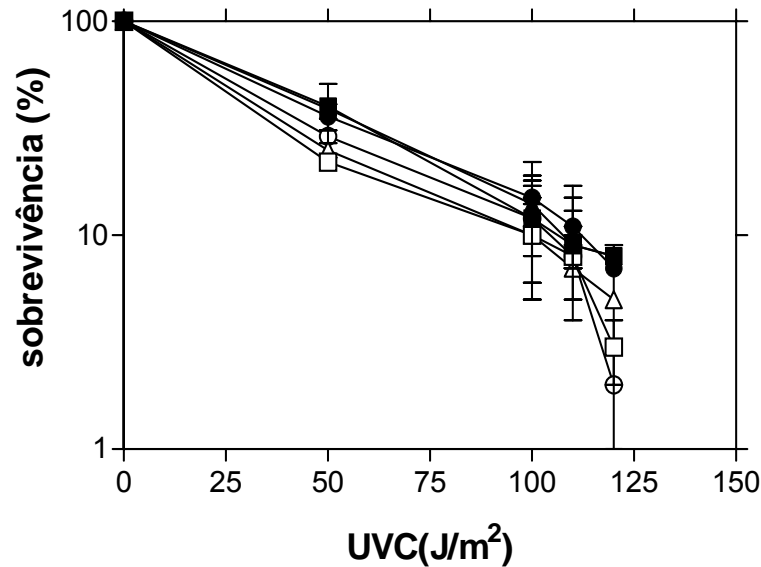


Figura 20. Sobrevivência das linhagens mutante *pso2-1* e selvagem transformadas com o plasmídeo vazio e contendo os genes *uvrB* e *uvrC* após tratamento com UVC. CL100 (quadrado preenchido); CL101 (triângulo preenchido); CL102 (círculo preenchido); CL200 (quadrado não preenchido); CL201 (triângulo não preenchido); CL202 (círculo não preenchido). As suspensões celulares foram tratadas em fase estacionária de crescimento.

4.6. INDUÇÃO DE MUTAÇÃO PARA FRENTE “FORWARD MUTATION”

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

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

O mutante *pso2-1* de *S. cerevisiae* é parcial ou totalmente bloqueado na indução de mutagênese (Brendel e Henriques, 2001), sendo que qualquer resultado diferente poderia ser atribuído aos genes *uvr*. Para os dois agentes mutagênicos testados (UVC e 8-MOP + UVA), não se verificou alteração na indução de mutagênese nas linhagens CL100, CL101, CL102, CL200, CL201, e CL202, como mostram as figuras 21 e 22, respectivamente.

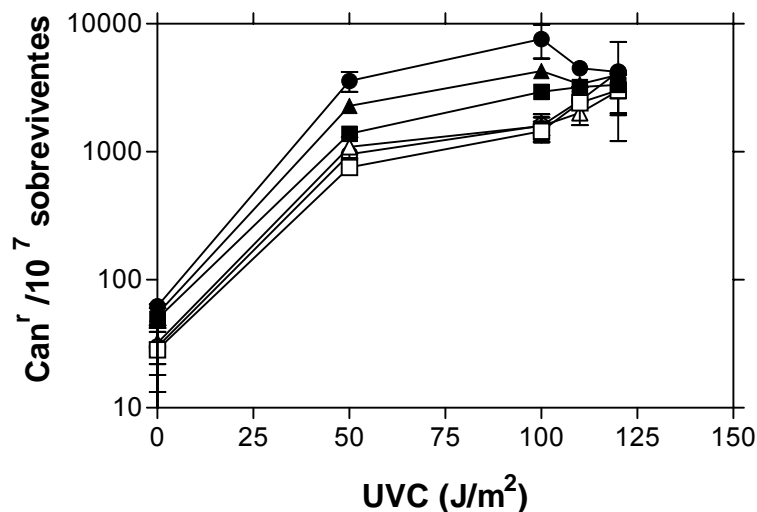


Figura 21. Indução de mutantes *can1^R* nas linhagens selvagem e mutante transformadas com o plasmídeo vazio e contendo o gene *uvrB* e *uvrC* após tratamento com UVC em função da dose. CL100 (quadrado preenchido); CL101 (triângulo preenchido); CL102 (círculo preenchido); CL200 (quadrado não preenchido); CL201 (triângulo não preenchido); CL202 (círculo não preenchido).

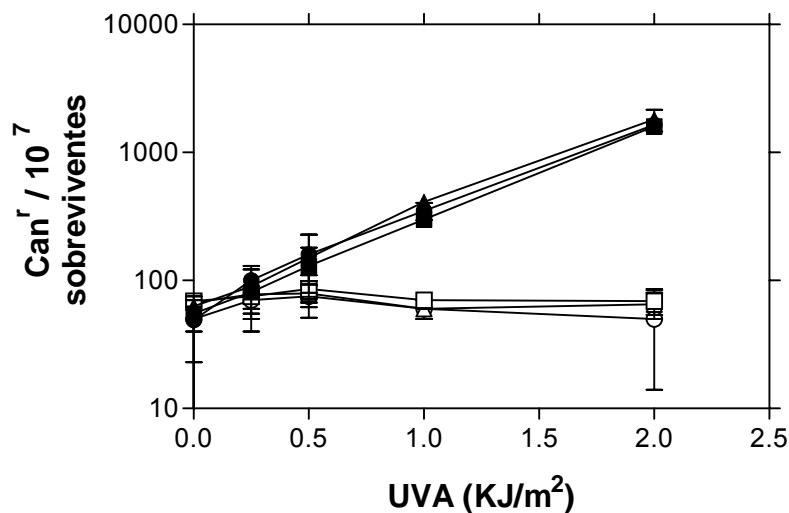


Figura 22. Indução de mutantes *can1^R* nas linhagens selvagem e mutante transformadas com o plasmídeo vazio e contendo o gene *uvrB* e *uvrC* após tratamento com 8-MOP + UVA em função da dose. CL100 (quadrado preenchido); CL101 (triângulo preenchido); CL102 (círculo preenchido); CL200 (quadrado não preenchido); CL201 (triângulo não preenchido); CL202 (círculo não preenchido).

5. DISCUSSÃO

Os organismos respondem a ação de agentes físicos e químicos capazes de alterar a integridade estrutural e funcional dos ácidos nucléicos por diferentes estratégias, tais como, modulação do ciclo celular, reparação do DNA, morte celular por citotoxicidade ou por apoptose (Jagetia *et al.*, 2001). Dentre essas estratégias, os mecanismos de reparação de DNA constituem ferramenta eficiente e versátil tanto na remoção direta do dano e correção fiel da seqüência nucleotídica, quanto na sinalização de morte celular. Sendo de extrema importância na manutenção da integridade genômica, não é surpreendente que deficiências no reparo estejam envolvidas na gênese, promoção e susceptibilidade ao câncer e doenças degenerativas. Dentre as lesões genotóxicas conhecidas, as pontes intercadeias, produzidas por drogas de uso terapêutico como o 8-MOP fotoativado, mitomicina C e cisplatina, constituem lesões consideravelmente citotóxicas, altamente mutagênicas, e que envolvem complexos mecanismos de reparo de DNA (Dronkert *et al.*, 2001; Brendel e Henriques, 2001; Brendel *et al.*, 2003).

Os mutantes *pso* de *S.cerevisiae* apresentam-se como ótimo modelo de estudo da reparação de pontes intercadeias em células eucarióticas (Brendel e Henriques, 1990; Henriques *et al.*, 1997; Brendel e Henriques, 2001; Brendel *et al.*, 2003), e o mutante *pso2-1* possui particular importância nesse contexto pela sua sensibilidade específica aos tratamentos com 8-MOP+UVA e mustarda nitrogenada (HN2) (Henriques e Moustacchi, 1980; Ruhland *et al.*, 1981). Desde o estabelecimento do alelismo entre os genes *PSO2* e *SNM1*, ficou claro que a ausência dessa proteína funcional conferia sensibilidade específica à agentes mutagênicos citotóxicos bi- ou poli-funcionais, mas o seu papel específico na reparação dessas lesões ainda permanecia desconhecido (Cassier e Moustacchi, 1988). Exemplificando, a importância de Pso2p no reparo dos crosslinks é tão grande, que a deleção desse gene não permite que o mutante sobreviva a mais que 30-50 crosslinks por genoma (Brendel e Henriques, 2001). Alguns estudos posteriores mostraram que o mutante *pso2/snm1* possuía a capacidade de cortar próximo às pontes intercadeias fotoinduzidas, mas não era capaz de reconstituir DNA de alta massa molecular, indicando então um bloqueio na etapa pós-excisão no mecanismo de reparação de pontes intercadeias no DNA, independente de sua natureza química (Magaña-Schwencke *et al.*, 1982; Wilborn e Brendel, 1989; Henriques *et al.*, 1997; Brendel e Henriques, 2003). De forma similar a mutantes de reparação pós-replicativa, mas contrastando com mutantes da via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), o mutante *pso2-1* é proficiente no processo de incisão perto de

sítios de DNA contendo pontes intercadeias no locus transcricionalmente ativos *MAT α* , mas não faz o mesmo no locus silencioso *HML α* , sugerindo uma associação de *PSO2* com NER de genes transcricionalmente ativos (Meniel *et al.*, 1995).

Alguns estudos também sugeriram a participação de Pso2p na modulação de cromatina associada com eventos de reparação de DNA enquanto outros, indicaram uma possível participação dessa proteína no reparo recombinacional (Henriques e Moustacchi, 1980; Saeki *et al.*, 1983; Magaña-Schwencke e Averbeck, 1991). O exato mecanismo pelo qual Pso2p participa no reparo de pontes intercadeias ainda permanece desconhecido.

Os estudos de reparação de pontes intercadeias causadas por 8-MOP e 3-CPS fotoativados em procariotos, sempre apontaram interessantes direções na elucidação dos mecanismos de reparo dessas lesões. O modelo proposto por Cole e colaboradores em *E. coli* (1973) envolve três passos importantes: (i) incisão em um lado do crosslink, (ii) recombinação e (iii) reparo por excisão utilizando o DNA incorporado por recombinação como molde para replicação. Dessa forma, esses processos envolveriam diversas proteínas tais como RecA, PolA e principalmente o complexo *UvrABC* (Grossmann *et al.*, 2001). O papel de *uvrABC* nesse processo dinâmico tem sido recentemente investigado e reavaliado (Lage *et al.*, 2003).

Em mutantes *uvrB* de *E.coli*, a sensibilidade a psoralenos fotoativados é muito alta, sugerindo o envolvimento da proteína *uvrB*, uma helicase tradicionalmente envolvida no reparo de lesões pela via de excisão de nucleotídeos (NER), na remoção dessa classe de danos (Lage *et al.*, 2003). Embora em *E.coli*, *uvrB* atue na via NER em um complexo formado com os produtos gênicos *uvrA* e *uvrC*, estudos com simples mutantes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* frente ao tratamento com agentes indutores de pontes intercadeias como a mitomicina C, mostraram que a ausência de *uvrA* e *uvrC* não afetava a resistência ao agente, ao contrário da resposta observada no mutante *uvrB* (Lage *et al.*, 2003). Esses estudos sugeriram um papel chave e específico para *uvrB* nesse evento de reparo de DNA, principalmente na remoção de monoadutos causados pelo tratamento com 3-CPS+UVA, embora outros resultados *in vitro* também possam sugerir um papel para *uvrA* e *uvrC* (Lage *et al.*, 2003). Em meio a estudos tão refinados e, às vezes, controversos, análises de sedimentação em gradiente alcalino de sacarose realizados nos mutantes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* após tratamento com 8-MOP+UVA mostraram dois fatos importantes: (i) as incisões no DNA lesado parecem não ser dependentes das funções das nucleases *uvrB* e *uvrC* e (ii) a ausência da função de *uvrB* impede a ressíntese de DNA de alta massa molecular (Lage *et al.*, 2003).

Considerando a similaridade dos fenótipos observados entre o mutante *ps02-1* de *S.cerevisiae* e *uvrB* de *E.coli* quanto a incapacidade da restituição do DNA de alta massa molecular após lesão com 8-MOP+UVA; a sensibilidade específica do mutante *ps02-1* a psoralenos fotoativados; a participação desconhecida e específica da proteína *uvrB* no reparo das lesões de psoralenos ativados por UVA em *E.coli*, e o fato da ação de *uvrB* ser independente do complexo *uvrABC* na remoção de lesões causadas por PUVA (fato que é contrário ao observado em adutos gerados pela mostarda nitrogenada HN2), o objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta fenotípica do mutante *ps02-1* transformado com os genes *uvrB* e *uvrC* de *E.coli* frente ao tratamento com PUVA em termos de citotoxicidade e mutagênese.

Em termos de sensibilidade ao tratamento com 8-MOP e 3-CPS fotoativados, a expressão de *uvrB* e *uvrC* não foi capaz de complementar o fenótipo de sensibilidade do mutante *ps02-1* nem total, nem parcialmente, bem como a resposta mutagênica ao tratamento com esses agentes. Nessa situação, é fundamental considerar a possibilidade de algumas condições importantes antes de descartar a hipótese de ausência de similaridade funcional ou cooperativa de *uvrB* em *ps02-1*. Embora os resultados experimentais de transcrição tenham mostrado a existência do mRNA codificador de *uvrB* e *uvrC* no mutante *ps02-1*, torna-se interessante considerar a possibilidade de problemas em nível de tradução, os quais inviabilizariam quaisquer probabilidades de alteração fenotípica no mutante.

Outro evento importante a ser considerado em expressão heteróloga é a possibilidade de diferentes eventos de modificação pós-tradução. É conhecido o fato que procariotos realizam pouquíssimas modificações pós-traducionais, citando-se apenas algumas adições de caudas lipídicas em certas proteínas. Contudo, é também relevante notar a diferença entre essas poucas modificações procarióticas e a grande gama de alterações realizadas em eucariotos inferiores. Ao analisar-se a seqüência de aminoácidos de *uvrB* e *uvrC* não se evidenciam seqüências de aminoácidos que possam ser confundidas com peptídeos sinais de exportação para retículo endoplasmático e complexo de Golgi, locais conhecidos da maioria das modificações pós-tradução em eucariotos. Dessa maneira, provavelmente esta hipótese não é a responsável pela ausência de complementação fenotípica observada na linhagem *ps02-1* transformada.

O último impedimento que poderia bloquear qualquer alteração fenotípica no mutante *ps02-1* transformado, poderia residir no fato que *uvrB* atua, na via NER, em complexo formado conjuntamente com *uvrA* e *uvrC*. Entretanto, como exposto anteriormente, sabe-se que o reparo de lesões de PUVA em *E.coli* requer a participação de *uvrB* independente de *uvrA* e *uvrC*. Dessa

forma é possível perceber que *uvrB* não é capaz de complementar o fenótipo de sensibilidade do mutante *ps02-1* a psoralenos fotoativados e radiação ultravioleta curta (254 nm). Esta análise é bastante surpreendente, pois revela dados contrários ao predito pela comparação fenotípica, mostrando que essas duas proteínas, quando ausentes ou não funcionais, impedem a restauração de DNA de alta massa molecular em seus organismos nativos, mas parecem não atuar pelo mesmo mecanismo quando expressas em *S.cerevisiae*.

Em *E.coli* o reconhecimento do dano pela via NER é acompanhado pelo complexo heterotrimérico *uvrA₂B*. Após a localização da lesão, o dímero *uvrA* dissocia-se do complexo e forma-se então *uvrB* ligado ao DNA contendo o aduto. A ligação de ATP induz uma mudança conformacional no DNA, a qual é pré-requisito para que a endonuclease *uvrC* catalise a primeira incisão na porção 3' da lesão. Na verdade, *uvrB* não possui ação nas incisões de remoção de dano, as quais são realizadas por *uvrC*. Pso2p está envolvida exclusivamente no passo pós-incisão durante a remoção dos adutos de psoralenos intercalados na dupla fita do DNA (Magaña-Schwencke *et al.*, 1982) e, portanto, parece justificável que não haja complementação do fenótipo *ps02-1* pelo gene *uvrB*, afastando qualquer possibilidade de funcionalidade semelhante entre essas proteínas. Recentemente foi demonstrado que a proteína Pso2/Snm1 possui função 5' exonucleásica (Li *et al.*, 2005) e, tal como seu homólogo em mamíferos, Artemis, poderia atuar em um passo pós-incisão para limpeza das extremidades geradas por outras nucleases, como o complexo MRX (D'Amours e Jackson, 2002). A limpeza destas extremidades é fundamental para a religação dos fragmentos e a restituição do DNA de alta massa molecular. Por outro lado, uma vez que *uvrC* realiza as incisões torna-se interessante investigar o efeito de sua expressão no mutante de *S.cerevisiae*.

A expressão de *uvrC* também não alterou a resposta fenotípica de *ps02-1*, o qual possui incisão normal ao crosslink no DNA, seja em termos de sobrevivência, seja em termos de mutagênese. Nesse caso, na remoção dos adutos, outras proteínas de reparação de DNA, funcionais no mutante, estão envolvidas e atuam sem a necessidade da ação de *uvrC*.

Sabe-se que a via de reparo por excisão de nucleotídeos é atuante na remoção de pontes intercadeias em *S.cerevisiae* (Dronkert *et al.*, 2001; Brendel e Henriques, 2001). Entretanto, mutantes defectivos em NER sempre são menos sensíveis que o mutante *ps02Δ*, sugerindo que a incisão por NER possa ser necessária, mas outras vias de reparo devem agir de maneira cooperativa para completa remoção da lesão (Grossmann *et al.*, 2001). Uma vez que a via NER é

íntegra em *pso2-1*, pode-se descartar a possibilidade dessa proteína atuar por um mecanismo semelhante ao de *uvrB* ou *uvrC* no processo de restituição de DNA de alta massa molecular.

A resposta a agentes causadores de pontes intercadeias em células eucarióticas é ainda muito pouco entendida (Dronkert *et al.*, 2001; Brendel e Henriques, 2001; Brendel *et al.*, 2003). Trabalhos de complementação fenotípica em eucariotos por meio de proteínas procarióticas, são capazes de adicionar informações interessantes ao contexto e contribuem para a proposição de partes de modelos de mecanismos de certas vias de reparação, e contribuem especialmente na investigação das proteínas Pso. A indução da expressão do gene RNR2, promovida pela presença do gene RecA de *E.coli* no mutante *pso4-1* de *S.cerevisiae*, permitiu propor uma direção no controle da resposta mutagênica em levedura (Morais *et al.*, 1994). Além disso, a complementação do fenótipo de sensibilidade e mutagênese induzida por peróxido de hidrogênio no mutante *pso3-1* transformado com o gene *nth* de *E.coli*, indicou uma possível função para Pso3p na remoção de bases oxidadas (Brozmannova *et al.*, 2001). Os nossos resultados indicam que Pso2p restitui o DNA de alta massa molecular em *S.cerevisiae* após a excisão de crosslinks, mas a maneira pela qual desempenha essa função não assemelha-se suficientemente ao modo pelo qual a proteína *uvrB* ou *uvrC* agem cooperativamente para a mesma finalidade em *E.coli*.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A expressão dos genes *uvrB* e *uvrC* de *E. coli* na linhagem selvagem e no mutante *ps02-1* de *S. cerevisiae* não foi capaz de restaurar os fenótipos de sensibilidade e mutagênese da linhagem mutante, afastando a possibilidade de homologia funcional entre esses genes, em especial na reconstituição do DNA de alta massa molecular no passo pós-incisão da remoção de pontes intercadeias do DNA.

Verificou-se a presença de transcritos dos genes *uvrB* ou *uvrC* em linhagens de *S. cerevisiae* transformadas com plasmídeos contendo esses insertos gênicos sob controle do promotor *ADH1* de levedura.

A expressão dos genes *uvrB* e *uvrC* de *E. coli* na linhagem *ps02-1* não foi capaz de restaurar o fenótipo de resistência a agentes genotóxicos como psoralenos fotoativados (8-MOP + UVA e 3-CPs + UVA) e radiação UVC.

A expressão dos genes *uvrB* e *uvrC* na linhagem mutante *ps02-1* também não causou alteração na frequência de mutação reversa induzida por 8-MOP + UVA e radiação UVC no loco *CAN1*.

Não foram observadas quaisquer incrementos na resposta de sensibilidade a psoralenos fotoativados ou radiação UVC na linhagem selvagem expressando *uvrB* ou *uvrC*.

Seria relevante dar continuidade a esse estudo tendo, como perspectiva geral, a obtenção de mais dados que indiquem que os genes *uvrABC* não possuem homologia funcional com o gene *PSO2/SNM1* de *S. cerevisiae*. Como perspectivas específicas podem ser citadas:

1. Confirmar a tradução das proteínas UvrB e UvrC nas linhagens transformadas por meio da técnica de “Western Blot” com uso de anticorpos específicos.
2. Realizar a subclonagem do gene *uvrA* no vetor de expressão de levedura, e testar os fenótipos de sensibilidade e mutagênese do mutante *ps02-1* transformado com o plasmídeo contendo este gene.

3. Construir novos vetores contendo diferentes marcas de seleção auxotróficas em *S. cerevisiae* que permitam a co-transformação com diversos plasmídeos. Assim, será possível transformar o mutante *ps02-1* com os genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* e analisar a ocorrência de complementação quando o complexo *UvrABC* estiver presente.

4. Realizar transformação da linhagem *ps02-1* com novos plasmídeos que permitam co-transformar *S. cerevisiae* com os genes *uvrB* e *uvrC* simultaneamente, seguido pela análise do fenótipo de sobrevivência e mutagenese em resposta à agentes genotóxicos.

5. Considerando que o gene *PSO5/RAD16* de *S. cerevisiae* codifica para uma importante helicase envolvida na reparação de DNA, seria interessante analisar uma possível complementação fenotípica do mutante *ps05/rad16* pelos gene *uvrB* de *E.coli*.

7. REFERÊNCIAS

- ARIKAN, E.; KULKARNI, M.S.; THOMAS, D.C.; SANCAR, A. Sequences of the *E. Coli uvrB* gene and protein. **Nucleic Acids. Res.**, v. 14, p. 2637-2650, 1986.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (eds.) **Curr. Protocols in Mol. Biol.**, New York: Wiley, 1995.
- AVERBECK, D. Photochemistry and photobiology of psoralens. **Proc. Jpn. Invest. Dermatol.**, v. 8, p. 52-73, 1984.
- AVERBECK, D.; DARDALHON, M.; MAGAÑA-SCHWENCKE, N.; MEIRA, L.B.; MENIEL, V. New aspects of the repair and genotoxicity of psoralen photoinduced lesions in DNA. **J Photochem. Photobiol. B: Biology**, v. 14, p. 47-63, 1992.
- BAILLY, V.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Domains required for dimerization of yeast Rad6 ubiquitin-conjugating enzyme and Rad18 DNA binding protein. **Mol Cell Biol**, v. 17, p. 4536-4543, 1997.
- BANG, D.D.; VERHAGE, R.; GOOSEN, N.; BROUWER, J.; VAN DE PUTE, P. Molecular cloning of *RAD16*, a gene involved in differential repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 2, p. 3925-3931, 1992.
- BENHAMOU, S.; SARASIN, A. Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. **Mutat. Res.**, v. 462, p. 149-158, 2000.
- BERNARD, P.; KEZDY, K.E.; VAN MELDEREN, L.; STEYAERT, J.; WYNS, L.; PATO, M.L.; HIGGINS, P.N.; COUTURIER, M. The plasmid F CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. **J. Mol. Biol.**, v. 234, p. 534-541, 1993.
- BRAITHWAITE, E.; WU, X.; WANG, Z. Repair of DNA lesions: mechanisms and relative repair efficiencies. **Mutat. Res.**, v. 424, p. 207-219, 1999.
- BRENDEL, M.; BONATTO, D.; STRAUSS, M.; REVERS, L.F.; PUNGARTNIK, C.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A P. Role of *PSO* genes in repair of DNA damage of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 544, p. 179-193, 2003.

- BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. The *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two GROUPS: ONE DEFICIENT IN DNA REPAIR AND ANOTHER WITH ALTERED MUTAGEN METABOLISM. **MUTAT. RES.**, V. 489, P. 79-96, 2001.
- BRENDEL. M.; HAYNES, R.H. INTERACTIONS AMONG GENES CONTROLLING SENSITIVITY TO RADIATION AND ALKYLATION IN YEAST. **MOL. GEN. GENET.**, V. 125, P. 197-216, 1973.
- BROZMANOVA, J.; VLCKOVA, V.; FARKASOVA, E.; VLASAKOVA, D.; CHOVANEC, M.; MIKULOVSKA, Z.; FRIDRICOVA, I.; SAFFI, J.; DUDAS, A.; HENRIQUES, J.A.P. INCREASED DNA DOUBLE strand breakage is responsible for sensitivity of the *pso3-1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* to hydrogen peroxide. **Mutat. Res.**, v. 485, p. 345-355, 2001.
- BROZMANOVA, J.; VLCKOVA, V.; CHOVANEC, M. How heterologously expressed *Escherichia coli* genes contribute to understanding DNA repair processes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Gent.**, v.46, p. 317-330, 2004.
- BURKE, D.; DAWSON, T.; STEARNS, T. Methods in Yeast Genetics, a CSH Laboratory course manual, CSH Laboratory Press, Plainview, N.Y. 2000.
- CALLEBAUT, I.; MOSHOUS, D.; MORNON, J.P.; de VILLARTAY, J.P. Metallo-B-lactamase fold within nucleic acids processing enzymes: the B-CASP family. **Nucleic Acids. Res.**, v. 30, p. 3592-3601, 2002.
- CASSIER, C.; MOUSTACCHI, E. Allelism between *pso1-1* and *rev3-1* mutants and between *pso2-1* and *sum1* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Gent.**, v.13, p. 37-40, 1988.
- CHAN, G.L.; DOETSCH, P.W.; HASELTINE, W.A. Cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts block polymerization by DNA polymerase I. **Biochemistry**, v. 24, p. 5723-5728, 1985.
- CLAASSEN, L.A.; GROSSMAN, L. Deletion mutagenesis of the E. Coli UvrA protein localizes domains for DNA binding, damage recognition, and protein-protein interactions. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 11388-11394, 1991.
- CLEAVER, J.E.; KARPLUS, K.; KASHANI-SABET, M.; LIMOLI, C.L. Nucleotide excision repair " a legacy of creativity". **Mutat. Res.**, v. 485, p23-36, 2001.

- D'AMOURS & JACKSON, S.P. The MRE11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. **Nat. Rev. in Mol. Biol.**, v. 3, p. 317-327, 2002.
- DALL'ACQUA, F.; MARCIANI MAGNO, S.; ZAMBON, F.; RODICHIERO, G.. Kinetic analysis of the photoreaction (365 nm) between psoralen and DNA. **Photochem. Photobiol.**, v. 29, p. 489-495, 1979.
- DOOLITTLE, R.F.; JOHNSON, I.; VAN HOUTEN, B.; SANCAR, A. Domainal evolution of a prokaryotic DNA repair protein and its relationship to active- transport proteins. **Nature**, v. 323, p. 451-453, 1986.
- DRONKERT, M.L.G.; KANAAR, R. Repair of DNA interstrand cross-links. **Mutat. Res.**, v. 486, p. 217-247, 2001.
- DRONKERT, M.L.G.; de WIT, J; BOEVE, M; VASCONCELOS, M. L; van STEEG, H; HOEIJMAKERS, J. H; KANAAR, R. Disruption of mouse SNM1 causes increased sensitivity to the DNA interstrand cross-linking agent mitomycin C. **Mol. Cell Biology**, v. 20, p. 4553-4561, 2000.
- FELDMANN, H.; DRILLER, L.; MEIER, B.; MAGES, G.; KELLERMANN, J.; WINNACKER, E.L. Hdf2, the 2nd subunit of the Ku homolog from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 27765-27769, 1996.
- FELDMANN, H.; WINNACKER, E.L. A putative homologue of the human autoantigen Ku from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 12995-12900, 1993.
- FOGLIANO, M.; SCHENDEL, P.F. Evidence for the duplicability of the *uvrB* operon. **Nature**, v. 289, p.196-198, 1981.
- FORSTER, J. W.; STRIKE, P. Organization and cont of de *Escherichia coli uvrC* gene. **Gene**. v. 35, p. 71-82, 1985.
- FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W. **DNA repair and mutagenesis**. Washington: ASM Press, USA, 1995.

- GAME J.C. The *Saccharomyces* repair genes at the end of the century. **Mutat. Res.**, v. 451, p. 277–293, 2000.
- GAME, J.C. DNA double-strand breaks and the *RAD50-RAD57* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Semin. Cancer Biol.**, v. 4, p. 73-83, 1993.
- GAME, J.C.; COX, B.S. Allelism test of mutants affecting sensitivity to radiation in yeast and a proposed nomenclature. **Mutat. Res.**, v. 12, p. 328-331, 1971.
- GAME, J.C.; MORTIMER, R.K. A genetic study of X-ray sensitive mutants in yeasts. **Mutat. Res.**, v. 24, p. 281-292, 1974.
- GASPARRO, F.P.; LIAO, B.; FOLEY, P.J.; WANG, X.M.; MADISON McNIFF, J. Psoralen photochemotherapy, clinical efficacy, and photomutagenicity: the role of molecular epidemiology in minimizing risks. **Envir. and Mol. Mutag.**, v. 31, p. 105-112, 1998.
- GELLERT, M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. **Annual Review of Biochemistry**. v. 71, p. 101-132, 2002.
- GIETZ, D.; STJEAN, A.; WOODS, R.A.; SCHIESTL, R. H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. **Nucleic. Acids Res.**, v. 20, p. 1425, 1992.
- GOFFEAU, A.; BARREL, B.G; BUSSEY, H.; DAVIS, R.W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J.D.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E.J.; MEWES, H.W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S.G.. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, p. 546-547, 1996.
- GREENBERG, R.B.; ALBERTI, M.; HEARST, J.E.; CHUA, M.A.; SAFFRAN, W.A. Recombinational and mutagenic repair of psoralen interstrand crosslinks in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 31551-31560, 2001.
- GROSSMANN, K.F; WARD, A; MATKOVIC, A. E. F; MOSES, R.E. *S. Cerevisiae* has three pathways for DNA interstrand crosslink repair. **Mutat. Res.**, v. 487, p. 73-83, 2001.
- GUZDER, S.N.; BAILLY, V.; SUNG, P.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Yeast DNA repair protein *RAD23* promotes complex formation between transcription factor TFIIH and DNA damage recognition factor *RAD14*. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 8385-8388, 1995.

- HAASE, E.; RIEHL, D.; MACK, M.; BRENDDEL, M. 1989. Molecular cloning of *SNM1*, a yeast gene responsible for a specific step in the repair of cross-linked DNA. **Mol. Gen. Genet.**, v. 218, p. 64-71, 1989.
- HALL, M.; MATSON, S. Helicases motifs: the engine that powers DNA unwinding. **Mol. Microbiol.**, v. 34, p. 867-877, 1999.
- HAMPSEY, M. A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 13, p. 1099-1133, 1997.
- HENRIQUES, J.A.P.; BRENDDEL, M. The role of *PSO* and *SNM* genes in dark repair of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 18, p. 387-393, 1990.
- HENRIQUES, J.A.P.; BROZMANOVA, J.; BRENDDEL, M. Role of *PSO* genes in the repair of photoinduced interstrand cross-links and photooxidative damage in the DNA of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, v. 39, p. 185-196, 1997.
- HENRIQUES, J.A.P.; MOUSTACCHI, E. Interaction between mutations for sensitivity to psoralen photoaddition (*pso*) and to radiations (*rad*) in yeast. **J. Bacteriol.**, v. 148 p. 248-256, 1981.
- HENRIQUES, J.A.P.; MOUSTACCHI, E. Isolation and characterisation of *pso* mutants sensitive to photoaddition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 95, p. 273-288, 1980.
- HIETER, P. The yeast genome and clinical genetics. **Clin. Genet**; v. 54, p. 113-116.
- HOEIJMAKERS, J.H.J. Nucleotide excision repair II: from yeast to mammals. **TIG**, v. 9, p. 211-217, 1993.
- HORIO, T. Indications and action mechanisms of photo-therapy. **J. Dermatol. Sci.**, v. 23 (Suppl. 1), p. S17-S21, 2000.
- JAGETIA, G.C.; JAYAKRISHANN, A.; FERNANDES, D.; VIDYSAGAR, M.S. **Mutat. Res.**, v. 491, p. 9-16, 2001.
- JAZAYERI, A.; JACKSON, S.P. Screening the yeast genome for new DNA-repair genes. **Genome Biol.** v. 3, p. 1009, 2003.

- JOHNSON, R.E.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase Pol eta. **Science**, v. 283, p. 1001-1004, 1999.
- KANAAR, R.; HOELJMAKERS, J.H.J. From competition to collaboration. **Nature**, v. 391, p. 335-327, 1998.
- KUNZ, B.A.; STRAFFON A.F.L.; VONARX E.J. DNA damage-induced mutation: tolerance via translesion synthesis. **Mutat. Res.**, v. 451, p. 169-185, 2000.
- KUPIECK, M. Damage-induced recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 4, p. 91-105. 2000.
- LAAT, W.L. de; JASPERS, N.G.J.; HOELJMAKERS, J.H.J. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. **Genes & Development**, v. 13, p. 768-785, 1999.
- LAGE, C.; PADULA, M.; ALENCAR, T.; GONÇALVES, S. R.; VIDAL, L.S.; NETO, J.C.; LEITÃO, A. C. New insights on how nucleotide excision repair could remove DNA adducts induced by chemoterapeutic agents and psoralens plus UV-A (PUVA) in *Escherichia coli* cells. **Mutat. Res.**, v. 544, p. 143-157, 2003.
- LAWRENCE, C. The RAD6 DNA repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: what does it do, and how does it do it? **Bioessays**, v. 16, p. 253-258, 1994.
- LAWRENCE, C.W.; GIBBS, P.E.M.; MURANTE, R.S.; WANG, X.-D.; LI, Z.; McMANUS, T.P.; MCGREGOR, W.G.; NELSON, J.R.; HINKLE, D.C.; MAHER, V.M. Roles of DNA polymerase ζ and Rev1 protein in Eukaryotic Mutagenesis and Translesion Replication. Cold Spring harbor Symposia on Quantitative Biology. **Biological Responses to DNA Damage**. v. LXV, p. 61-69, 2000.
- LAWRENCE, C.W.; HINKLE, D.C. DNA polymerase zeta and the control of DNA damage induced mutagenesis in eukaryotes. **Cancer Surveys**, v. 28, p. 21-31, 1996.
- LI, X; HEJNA, J; MOSES, R.E. The yeast Ssm1 protein is a DNA 5'-exonuclease. **DNA repair**, v. 4, p. 163-170, 2005.

- LIN, J.J.; SANCAR, A. Active site of (A)BC excinuclease. I. Evidence for 5'incision by UvrC through a catalytic site involving Asp399, Asp438, Asp466, and His538 residues. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 17688-17692, 1992.
- LIN, J.J.; SANCAR, A. Reconstitution of nucleotide excision nuclease with UvrA and UvrB proteins from *Escherichia coli* and UvrC protein from *Bacillus subtilis*. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 21337-21341, 1990.
- MA, Y.; PANNICKE, U.; SCHWARWS, K.; LIEBER, M. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. **Cell.**, v. 108, p. 781-794, 2002.
- MAGAÑA-SCHWENCKE, N.; AVERBECK, D. Repair of exogenous plasmid dna damaged by photoaddition of 8-methoxy-psoralen in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 251, p. 123-131, 1991.
- MAGAÑA-SCHWENCKE, N.; HENRIQUES, J.A.P.; CHANET, R.; MOUSTACCHI, E. The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced cross-links in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair deficient strains. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 79, p. 1722-1726, 1982.
- MELLON, I.; HANAWALT, P.C. Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. **Nature**, v. 342, p. 95-98, 1989.
- MENIEL, V.; MAGAÑA-SCHWENCKE, N.; AVERBECK, D. Preferential repair in *Saccharomyces cerevisiae* *rad* mutants after induction of interstrand cross-links by 8-methoxypsoralen plus UVA. **Mutagenesis**, v. 10, p. 543-548, 1995.
- MINKO, I.G.; ZOU, Y.; LLOYD, S. Incision of DNA-Protein crosslinks by UvrABC nuclease suggests a potential repair pathway involving nucleotide excision repair. **Biochemistry**, v. 99, p. 1905-1909, 2001.
- MOOLENAAR, G.F.; FRANKEN, K.; van DE PUTTE, P.; GOOSEN, N. **Mutat. Res.**, v. 385, p.195-203, 1997.
- MOOLENAAR, G.F.; HOGLUND, L.; GOOSEN, N. Clue to damage recognition by UvrB: residues in the beta-hairpin structure prevent binding to non-damaged DNA. **EMBO J.** v. 20, p. 6140-6149, 2001

- MORAIS, M.A. Jr.; BROZMANOVA, J.; BENFATO, M.S.; DURAJ, J.; VLEKOVA, V.; HENRIQUES, J.A.P. The *E. Coli recA* gene can restore the defect in mutagenesis of the *psa4-1* mutant of *S. cerevisiae*. **Mutat. Res.**, p. 209-220, 1994.
- MOSHOUS, D.; CALLEBAUT, I.; de CHASSEVAL, R.; CORNEO, B.; CAVAZZANA-CALVO, M., Le DIEST, F.; TEZCAN, I.; SANAL, O.; BERTRAND, Y.; PHILIPPE, N.; FISHER, A.; de VILLARTAY, J.P. Artemis, a novel DNA double-strand break repair/ V(D)J recombination protein, is mutated in human combined immune deficiency. **Cell**, v. 105, p. 177-186, 2001.
- MOUSTACCHI, E.; CASSIER, C.; CHANET, R.; MAGAÑA-SCHWENCKE, N.; SAEKI, N.; HENRIQUES, J.A.P. Biological role of photoinduced crosslinks and monoadducts in yeast DNA: genetic control and steps involved in their repair. In: FRIEDBERG, E.C.; BRIDGES, A.B. (eds). **Cellular Responses to DNA Damage**. New York: Alan Liss Inc., p. 87-106, 1983.
- NICKOLOFF, J.A.; HOEKSTRA, M.F. **DNA damage and repair**. Totowa, New Jersey: Human Press, 1998.
- PÂQUES, F.; HABER, J.E. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol. Biol. Ver.**, v. 63, p. 349-404, 1999.
- PARSHAD, R.; SANFORD, K.K. Radiation-induced chromatid breaks and deficient DNA repair in cancer predisposition. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 37, p. 87-96, 2001.
- PRAKASH, L. The relation between repair of DNA and radiation and chemical mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 41, p. 241-248, 1976.
- PRAKASH, S.; JOHNSON, R.E.; WASHINGTON, M.T.; HARACSKA, L.; KONDRATICK, C.M. ; PRAKASH L. Role of Yeast and human DNA polymerase η in error-free replication of damaged DNA. Cold Spring harbor Symposia on Quantitative Biology. **Biological Responses to DNA Damage**. v. LXV p. 51-59, 2000.
- PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Nucleotide excision repair in yeast. **Mutat. Res.**, v. 451, p. 13-24, 2000.
- RESNICK, M.A.; COX, B.S. Yeast as a honorary mammal. **Mutat. Res.**, 451, p1-11, 2000.

- REVERS, L. F.; Caracterização molecular dos genes *PSO2* e *PSO4* de *Saccharomyces cerevisiae* envolvidos na reparação do DNA: análise funcional e identificação de interações proteína-proteína. Porto Alegre, UFRGS. 124p, 2003 Tese de Doutorado – Curso de Pós-Graduação em Bioquímica.
- RICHTER, D.; NIEGEMANN, E.; BRENDDEL, M. Molecular structure of the DNA cross-link repair gene *SNM1* (*PSO2*) of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 231, p. 194–200, 1992.
- RUHLAND, A.; HAASE, E.; SIEDE, W.; BRENDDEL, M. Isolation of yeast mutants sensitive to the bifunctional alkylating agent nitrogen mustard. **Mol. Gen. Genet.**, v. 181, p. 346-351, 1981.
- SAEKI, T.; CASSIER, C.; MOUSTACCHI, E. Induction in *Saccharomyces cerevisiae* of mitotic recombination by mono- and bi-functional agents: comparison of the *pso2-1* and *rad52* repair deficient mutants to the wild-type. **Mol. Gen. Genet.** v. 190, p. 255-264, 1983.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.R.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- SANCAR, A.; SANCAR, G.B.; RUPP, W.D.; LITTLE, J.W.; MOUNT, D.W. Lex A protein inhibits transcription of the *E. Coli uvrA* gene in vitro. **Nature**, v. 298, p. 96-98, 1982.
- SANCAR, G.B.; SIEDE, W.; ZEELAND, A.A. Repair and processing of DNA damage: a summary of recent progress. **Mutat. Res.**, v. 362, p. 127-146, 1996.
- SCHENDEL, P.F.; FOGLIANO, M.; STRAUSBAUGH, L.D. Regulation of the *Escherichia coli* K-12 *uvrB* operon. **J. Bacteriol.** v. 150, p. 676-685, 1982.
- SELBY, C.P.; SANCAR, A. Molecular mechanism of transcription repair coupling. **Science**, v. 260, p. 53-58, 1993.
- SHINOHARA, A.; OGAWA, T. Stimulation by Rad52 of yeast Rad51- mediated recombination. **Nature**, v. 391, p. 404-407, 1998.
- SIEDE, W.; FRIEDL, A. A.; DIANOVA, I.; ECKARDT SCHUPP, F.; FRIEDBERG, E.C. The *Saccharomyces cerevisiae* Ku autoantigen homologue affects radiosensitivity only in the absence of homologous recombination. **Genetics** v. 142, p. 91-102, 1996.

SKORVAGA, M.; THEIS, K.; MANDAVILLI, B.S.; KISKER, C.; VAN HOUTEN, B. The beta -hairpin motif of *UvrB* is essential for DNA binding, damage processing, and *UvrC*-mediated incisions. **J. Biol. Chem.**; v. 277, p.1553-1559, 2002.

SKORVAGA, M.; DELLA VECCHIA, M.J.; CROTEAU, D.L.; THEIS, K.; TRUGLIO, J.J.; MANDAVILLI, B.S.; KISKER, C.; VAN HOUTEN, B. Identification of Residues within *UvrB* that are important for efficient DNA binding and damage processing. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 51574-51580, 2004.

SMITH, G.C.M. JACKSON, S.P. The DNA-dependent protein kinase. **Genes & Development**, v. 13, p. 916-934, 1999.

SWEDER, K.S. Nucleotide excision repair in yeast. **Curr. Genet.**, v. 27, p. 1-16, 1994.

SWEDER, K.S.; HANAWALT, P.C. Preferential repair of cyclobutane pyrimidine dimers in the transcribed strand of a gene in yeast chromosomes and plasmids is dependent on transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 10696-10700, 1992.

TAVTIGIAN, S.; J. SIMARD, D. H. TENG, V. ABTIN, M. BAUMGARD, A BECK, N. J. CAMP, A. R. CARILLO, Y. CHEN, P. DAYANANTH, M. DESROCHERS, M. DUMONT, J. M. FARNHAM, D. FRANJ, C. FRYE, S. GHAFARI, J. S. GUPTA, R. HU, D. ILIEV, T. JANECK, E. N. KORT, K. E. LAITY, A. LEAVITT, G. LEBLANC, J. MCARTHUR-MORRISON, A. PEDERSON, B. PENN, K.T. PETERSON, J.E. REID, S. RICHARDS, M. SCHROEDER, R. SMITH, S. C. SNYDER, B. SWEDLUND, J. SWENSEN, A. THOMAS, M. TRANCHANT, A. M. WOODLAND, F. LABRIE, M. H. SKOLNICK, S. NEUHAUSEN, J. ROMMENS, ANDE L. A. CANNON-ALBRIGHT. A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. **Nat. Genet.** v. 27, p 172-180, 2001.

TAYLOR, E.M.; LEHMANN, A R. Review: Conservation of eukaryotic DNA Repair mechanisms. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 74, p. 277-286, 1998.

TAYLOR, J.S.; GARRET, D.S.; COHRS, M.O. Solution-state structure of the Dewar pyrimidine photoproduct of thymidyl-(3'-5')-thymidine. **Biochemistry**, v.27, p. 7206-7215, 1988.

THEIS, K.; SKORVAGA, M.; MACHIUS, M.; NAKAGAWA, N.; VAN HOUTEN, B.; KISKER, C. The nucleotide excision repair protein *UvrB*, a helicase-like enzyme with a catch. **Mutat. Res.**, v. 460, p. 277-300, 2000.

- VAN DER BERG, E.A.; GEERSE, R.H.; VAN DE PUTTE, P. In vivo transcription of the *E. Coli* *uvrB* gene: both promoters are inducible by UV. **Nucleic Acids Res.**, v. 11, p. 4355-4363, 1983.
- VAN HOFFEN; A.; NATARAJAN, A.T.; MAYNE, L.V.; Van ZEELAND, A.A; MULLENDERS, L.H.F.; VENEMA, J. Deficient repair of the transcribed strand of active genes in Cockayne's syndrome cells. **Nucl. Acids Res.** v. 21, p. 5890-5895, 1993.
- VAN HOUTEN, B. Nucleotide excision repair in *E. Coli*. **Microbiol. Rev.** v. 54, p. 18-51, 1990.
- VAN HOUTEN, B.; EISEN, J.; HANAWALT, P. A cut above: Discovery of an alternative excision repair pathway in bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 2581-2583, 2002.
- VERHAGE, R.A.; VAN DE PUTE, P.; BROUWER, J. Repair of rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*: RAD4-independent strand-specific nucleotide excision repair of RNA polymerase I transcribed genes. **Nucleic Acids Res.**, v. 24, p. 1020-1025, 1996.
- VERHOEVEN, E. E.; KESTEREN, M.; MOOLENAAR, R.; VISSE, R.; GOODEN, N. Catalytic sites for the 3' and 5' incision of *Escherichia coli* nucleotide excision repair are both located in UvrC. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 5120-5120, 1999.
- WANG, J.; GROSSMAN, L. Mutations in the helix turn-helix motif of the *E. Coli* UvrA protein eliminate its specificity for UV-damaged DNA. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 5323-5331, 1993.
- WILBORN, F.; BRENDDEL, M. Formation and stability of interstrand cross-links induced by cis- and trans-diamminedichloroplatinum (II) in the DNA of *Saccharomyces cerevisiae* strains differing in repair capacity. **Curr. Gent.**, v.16, p. 331-338, 1989.
- WOLTER, R.; SIEDE, W.; BRENDDEL, M. Regulation of *SNM1*, an inducible *Saccharomyces cerevisiae* gene required for repair of DNA cross-links. **Mol. Gen. Genet.**, v. 250, p. 162-168, 1996.
- WOOD, R.D. Nucleotide excision repair in mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 23465-23468, 1997.

XIAO, W.; CHOW, B.L.; BROOMFIELD, S.; HANNA, M. The *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 group is composed of an error-prone and two error-free postreplication repair pathways. **Genetics**, v. 155, p 1633-1641, 2000.

ZOU, Y.; VAN HOUTEN, B. Strand opening by the UvrA(2)B complex allows dynamic recognition of DNA damage. **EMBO J.** v. 18, p. 4889-4901, 1999.

ZWETSLOOT, J.C.M.; BARBEIRO, A. P.; VERMEULEN, W.; ARTHUR, H.M.; HOEIJMAKERS, J.H.J.; BACKENDORF, C. Microinjection of *Escherichia coli* UvrA, B, C and D proteins into fibroblasts of xeroderma pigmentosum complementation groups A and C does not result in restoration of UV-induced unscheduled DNA synthesis. **Mutat. Res.**, v. 166, p89-98, 1986.