



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica

**Caracterização molecular dos genes *PSO2* e *PSO4* de *Saccharomyces cerevisiae* envolvidos na reparação do DNA: análise funcional e identificação de interações proteína-proteína**

**Luís Fernando Revers**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos para obtenção do título de **Doutor em Ciências**.

**Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques**

Porto Alegre, 2003.

Aos meus pais, Antonio e Elenice, que me deram alicerce para chegar a mais um momento de conquista,

A minha namorada, Jacqueline, pela paciência, estímulo, hospedagem e ajuda incansável.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Radiobiologia e no GENOTOX - Laboratório de Genotoxicidade do Centro de Biotecnologia desta Universidade e no Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians Universität, München - Alemanha. O projeto foi subvencionado pela Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), 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. A pesquisa em Colaboração com o Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians Universität foi realizada com o apoio do convênio DAAD-CAPES.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Henriques, pela grande oportunidade de aprendizado, pelo apoio e confiança no meu trabalho e, acima de tudo, pela amizade. Com tudo isso foi possível concluir mais esta etapa. Espero sempre poder contar com a tua colaboração no futuro.

Ao Prof. Martin Brendel, meu segundo orientador, sou muito grato pelas longas discussões científicas, hospedagem e passeios em Frankfurt, bons vinhos e pelo exemplo de correção e ética na Ciência.

À Heidi Feldmann, minha orientadora em Munique agradecimentos especiais por colocar à disposição as instalações do Genzentrum, pela paciência e oportunidade de desenvolver parte deste trabalho.

A todos os companheiros dos laboratórios 201, 205, 206, 210, 219 e GENOTOX. De ontem e de hoje. Obrigado pela convivência amiga!

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular Vegetal e Laboratório de Imunologia, pelo bate-papo amigável, softwares e troca de reagentes necessários. Fica aqui um agradecimento especial ao amigo colorado Carlos Alexandre Sanchez Ferreira, companheiro de longa data.

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

Às antigos colegas e companheiros de pós-graduação, pelos jogos de futebol, boas conversas e amizade que persistem desde a primeira pós graduação.

Aos meus pais, Antonio e Elenice, por terem me oferecido livre arbítrio e pela confiança na minha opção. Agradeço por toda paciência e apoio que recebi ao longo desta fase da minha formação profissional.

A EMBRAPA pelo emprego, incentivo e apoio na etapa final da realização deste trabalho.

A minha namorada Jacqueline, obrigado pelo amor, companheirismo, tranquilidade, compreensão, paciência, dedicação e pela hospedagem em Porto Alegre, muitas vezes premiada com excelente culinária. Espero contar com a tua presença para vãos ainda mais altos...

Este trabalho apresenta-se organizado da seguinte forma: a introdução aborda os aspectos mais relevantes do atual conhecimento sobre os mecanismos de reparação do DNA, descrevendo também as características dos genes *PSO* e como estes se integram e contribuem para o estudo da reparação do DNA em *Saccharomyces cerevisiae* e em modelos de eucariotos superiores. Uma discussão geral busca integrar os achados descritos nos capítulos anteriores. Na seqüência, são descritas as conclusões e as perspectivas geradas por este trabalho. Em anexo, consta o artigo “O sistema dois-híbridos de *Saccharomyces cerevisiae*: variações e potencial para a montagem de redes de interação proteína-proteína”, uma revisão sobre esta metodologia que permitiu as primeiras análises de interações proteicas em escala genômica. Também são apresentados em anexos, dados não mostrados nos artigos relatados nos capítulos 2 e 3.

"Aqueles que se enamoram somente da prática, sem cuidar da teoria, ou melhor dizendo, da ciência, são como o piloto que embarca sem timão nem bússola. A prática deve alicerçar-se sobre uma boa teoria, à qual serve de guia a perspectiva; e em não entrando por esta porta, nunca se poderá fazer coisa perfeita, nem na pintura, nem em nenhuma outra profissão"

(Leonardo Da Vinci, 1452 – 1519)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	i
<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b>	iii
<b>RESUMO</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	vi

### **CAPÍTULO I**

#### **INTRODUÇÃO**

1.1 Agentes que lesionam a célula	10
1.1.1 Radiação Ultravioleta	10
1.1.2 UV mimético: óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO)	14
1.1.3 Agentes Alquilantes	15
1.1.4 Psoralenos/Furucumarinas	16
1.2 Vias de Reparação do DNA	17
1.2.1 Reparação por excisão de nucleotídeos (NER)	18
1.2.2 Reparação pós-replicativa e/ou mutagênica	19
1.2.3 Reparação de DNA por recombinação homóloga	24
1.2.4 Reparação de DNA por recombinação não-homóloga ou ilegítima	27
1.3 Os mutantes <i>PSO</i>	28
1.3.1 Os genes <i>PSO2</i> e <i>PSO4</i>	33
1.4. Análise funcional de interações proteína-proteína: a utilização do sistema dois-híbridos.	36
1.5. Objetivos	37
1.5.1. Objetivos específicos	37

### **CAPÍTULO II**

38

“Thermoconditional modulation of the pleiotropic sensitivity phenotype by the *Saccharomyces cerevisiae* *PRP19* mutant allele *pso4-1*”

<b>CAPÍTULO III</b>	50
“Further Characterization of the Yeast Repair Gene <i>PSO2/SNMI</i> : New phenotypes, Isolation of Potential Binding Partners of Pso2p and Genetic Interaction after DNA Damage Treatments”	
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>DISCUSSÃO</b>	77
4.1. As interações proteína-proteína obtidas com Pso2p e Pso4p	78
4.2. O fenótipo pleiotrópico do mutante <i>pso4-1</i> e sua influência na reparação do DNA e processamento de pre-mRNA	80
4.3. Dinâmica da interface matriz nuclear-cromatina e reparação do DNA	81
4.4. Integrando a participação de Pso2p na reparação de ICLs em <i>S. cerevisiae</i>	83
4.5. Pso2p como membro da família $\beta$ -CASP de proteínas envolvidas em metabolismo de DNA	87
<b>CAPÍTULO V</b>	
<b>CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS</b>	89
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	94
<b>ANEXOS</b>	
<b>Anexo 1</b>	111
“O sistema dois-híbridos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : variações e potencial para a análise funcional e montagem de redes interações proteína-proteína”	
<b>Anexo 2</b>	117
Dados complementares não mostrados no artigo relatado no capítulo 2	
<b>Anexo 3</b>	122
Dados complementares não mostrados no artigo relatado no capítulo 3	



## LISTA DE ABREVIATURAS

3-CPs	3-carbetoxipsoraleno
4-NQO	óxido de 4-nitroquinoleína
8-MOP	8-metoxipsoraleno
8HQ	8-hidroxiquinolina
AP	sítios apurínicos/apirimidínicos
ACA	Acetaldeído
ATP	adenosina trifosfato
BER	reparação por excisão de bases
C-C	dímero de pirimidina citosina-citosina
CPD	dímero de pirimidinas ciclobutano
DEN	dietilnitrosamina
DEO	1,2,7,8-diepoxioctano
DNA	ácido desoxiribonucléico
DSB	quebras duplas do DNA
EMS	etil metanosulfonato
ERO	espécie reativa de oxigênio
H <sub>2</sub> O	água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
HN1	mustarda nitrogenada monofuncional
HN2	mustarda nitrogenada bifuncional
ICL	ponte intercadeia
MMS	metilmetano sulfonado
MNNG	N-metil-N <sup>1</sup> -nitro-N-nitrosoguanidina

NEF-	fator de excisão de nucleotídeos
NER	reparação por excisão de nucleotídeos
ORFs	quadro aberto de leitura
PCR	reação de polimerização em cadeia da polimerase
PIBIS	Tricotiodistrofia
RT-PCR	reação de polimerização em cadeia da polimerase mediada pela transcriptase reversa
RNA	ácido ribonucléico
SC	Síndrome de Cockaine
TLS	Síntese translesão
T-T	dímero de pirimidina timina-timina
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; importante para o processo de maturação de células B e T do sistema imune
XP	xeroderma pigmentosum

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura/Tabela	Pág.
<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida da levedura <i>S. cerevisiae</i> . Células haplóides de sinais de acasalamento diferentes ( <i>MATa</i> e <i>MATα</i> ) podem formar células diplóides, capazes de esporular (meiose) e retornar ao crescimento vegetativo haplóide, permitindo análise genética da segregação. As etapas principais da prófase meiótica estão listadas na parte inferior da figura. Modificado de Dresser <i>et al.</i> (2000).	11
<b>Figura 2.</b> Tipos de lesões induzidas por diferentes agentes indutores de danos no DNA. (modificado de Balajee e Bohr, 2000).	12
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática de um anel ciclobutano entre duas timinas na mesma cadeia de DNA e um fotoproducto 6-4, produzido pela ligação entre o C6 de uma timina e o C4 da timina adjacente.	13
<b>Figura 4.</b> Estrutura molecular das furocumarinas e alguns derivados.	16
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática da fotoadição de furocumarinas ao DNA. Após a intercalação da molécula de psoraleno entre os pares de bases do DNA, um fóton de 365 nm é absorvido gerando uma monoadição. Monoadições do tipo 4',5' permitem a absorção de um segundo fóton de 365 nm e formação de pontes ligando pirimidinas adjacentes.	18
<b>Figura 6.</b> Representação gráfica dos três tipos básicos de interações gênicas que são possíveis em linhagens duplo mutantes em <i>loci</i> que participam de processos de reparação do DNA. O duplo mutante <i>mn</i> , se houver interação epistática entre os genes, não deverá ser mais sensível do que o mais sensível simples mutante <i>n</i> ; se a interação dos dois genes aumenta a sensibilidade do duplo mutante de modo a torná-lo mais sensível que o simples mutante <i>n</i> , pode-se ter uma interação aditiva (onde $AE=AC+BD$ ) ou uma interação sinérgica (onde $AE'>AE$ ).	21
<b>Figura 7.</b> Rede de grupos funcionais proposta para <i>S. cerevisiae</i> . Em azul são mostradas as classes funcionais onde se classificam as proteínas codificadas pelos genes identificados como interatores Pso2 e Pso4p com função conhecida. Genes identificados como interatores do Pso4p estão identificados em vermelho e do gene Pso2p em verde. Modificado de Tucker <i>et al.</i> , 2001	79
<b>Figura 8.</b> Modelo de complexos de reparação do DNA associados à matriz nuclear. (modificado de Mauldin <i>et al.</i> , 2002).	84
<b>Tabela 1.</b> Grupos de epistasia dos genes de <i>S. cerevisiae</i> envolvidos em reparação de danos no DNA	20
<b>Tabela 2.</b> Propriedades das proteínas codificadas pelos genes <i>PSO</i> e os fenótipos dos seus alelos mutantes <sup>a</sup>	29

## RESUMO

O alelo mutante termo-condicionalmente letal *pso4-1* do gene *PRP19*, que codifica uma proteína associada ao spliceossoma, permitiu investigar a influência deste gene no processamento de pré-mRNA, reparação do DNA e esporulação. Fenótipos relacionados a genes portadores de introns foram correlacionados à temperatura. Sistemas repórteres para processamento de pré-mRNA e RT-PCR mostraram que eficiência de processamento de mRNA no mutante *pso4-1* é inversamente correlacionada com a temperatura de crescimento. Uma mutação pontual, substituindo uma leucina por uma serina foi identificada dentro da região codificadora N-terminal do alelo *Pso4-1* e afeta as propriedades bioquímicas de Pso4-1p. Entre 24 clones isolados utilizando o sistema dois-híbridos, 7 foram identificados como partes dos genes *RAD2*, *RLF2* e *DBR1*. *RAD2* codifica uma endonuclease indispensável para a via reparação por excisão de nucleotídeos (NER), *RLF2* codifica a subunidade maior do fator de montagem da cromatina I, cuja deleção resulta em insensibilidade à radiação UVC, enquanto que *DBR1* codifica uma enzima que atua sobre substratos de RNA na forma lariat, degradando estruturas lariat em introns durante o processamento de mRNA. A caracterização dos fenótipos após tratamentos com mutágenos em linhagens mutantes simples e duplos de *rad2Δ*, *rlf2Δ* e *pso4-1* mostraram sensibilidade aumentada para para mutantes *rad2Δ/pso4-1* e *rlf2Δ/pso4-1*, sugerindo uma interferência funcional destas proteínas no processo de reparação do DNA em *Saccharomyces cerevisiae*.

O mecanismo exato de reparação de pontes inter-cadeia (ICL) em *S. cerevisiae* não é ainda totalmente conhecido. Identificando novos fenótipos e isolando proteínas potencialmente capazes de interagir com Pso2p através da técnica do sistema dois-híbridos, foi possível estender a caracterização deste gene específica para reparação de pontes inter-cadeia. Tratamentos com acetaldeído (ACA), um metabólito natural da via glicolítica, foi mais tóxico a linhagem mutante *pso2* em comparação com a linhagem selvagem e também capaz de induzir a expressão da fusão contendo o promotor de *PSO2* à *lacZ* (*PSO2-lacZ*) por um fator comparável à tratamentos com outros agentes indutores de ICLs, indicando que o metabólito natural ACA pode causar danos do tipo ICL em *S. cerevisiae*. A utilização do sistema dois-híbridos permitiu isolar partes de proteínas codificadas por nove diferentes genes, entre eles a proteína quinase Pak1p, um supressor de mutações termo-sensíveis da DNA Polimerase alfa. Pak1p interage com a extremidade C-terminal conservada de Pso2p, uma região da proteína recentemente nomeada  $\beta$ -CASP entre

ortólogos conhecidos do gene *PSO2*. A integridade do domínio  $\beta$ -CASP é essencial para a reparação de DNA proficiente como demonstrado em ensaios de complementação com mutantes *pso2* $\Delta$ . Comparação da sobrevivência após tratamento com agentes mutagênicos de simples mutantes *pso2* $\Delta$  e *pak1* $\Delta$  assim com o duplo mutante *pso2* $\Delta$ /*pak1* $\Delta$  revelaram que o gene *PAK1* é necessário para reparação do DNA proficiente como na linhagem selvagem. A interação epistática dos dois alelos mutantes na linhagem duplo mutante sugere que Pak1p atua na mesma via de reparação a qual *PSO2* pertence e que *PAK1* constitui um novo locus envolvido na reparação do DNA em *S. cerevisiae*.

## ABSTRACT

The conditionally lethal *pso4-1* mutant allele of the spliceosomal associated *PRP19* gene allowed to study this gene's influence on pre-mRNA processing, DNA repair and sporulation. Phenotypes related to intron-containing genes were correlated to temperature. Splicing reporter systems and RT-PCR showed splicing efficiency in *pso4-1* to be inversely correlated to growth temperature. A single aa substitution replacing leucine by serine was identified within the N-terminal region of the *pso4-1* allele and was shown to affect the interacting properties of Pso4-1p. Amongst 24 interacting clones isolated in a two hybrid screening, 7 could be identified as parts of the *RAD2*, *RLF2* and *DBR1* genes. *RAD2* encodes an endonuclease indispensable for NER, *RLF2* encodes the major subunit of the chromatin assembly factor-I, whose deletion causes sensitivity to UVC radiation, while *DBR1* encodes the lariat RNA splicing debranching enzyme, which degrades intron lariat structures during splicing. Characterization of mutagen sensitivity phenotypes of *rad2Δ*, *rlf2Δ* and *pso4-1* single and double mutant strains showed enhanced sensitivities for the *rad2Δ pso4-1* and *Rlf2Δ pso4-1* double mutants, suggesting a functional interference of these proteins in DNA repair processes in *S. cerevisiae*.

The exact mechanism of interstrand cross-link (ICL) repair in yeast is still not well understood. By identifying new phenotypes and isolating putative binding partners through the two-hybrid system we further extended the characterization of the specific ICL repair gene *PSO2*. Treatments with the glycolytic metabolite acetaldehyde (ACA) was shown to be more toxic to *pso2* mutants than to the corresponding WT, and also capable to induce a *PSO2-lacZ* fusion promoter by a factor comparable to that found for known DNA interstrand cross-link inducing treatments, thus indicating that the natural metabolite ACA might form ICL in yeast DNA. Isolation of potential binding partners of Pso2p using the two hybrid system identified nine different fusion protein products, among them part of the protein kinase Pak1p, a temperature-sensitive suppressor of DNA Polymerase  $\alpha$  mutations. Pak1p interacted with the C-terminal conserved region of Pso2p, a domain recently named  $\beta$ -CASP among the known Pso2p-like orthologues. Integrity of the  $\beta$ -CASP domain was shown to be essential for WT-like DNA repair in *pso2Δ* complementation assays. The comparison of mutagen-sensitivity phenotypes of *pso2Δ* and *pak1Δ* single as well as the *pso2Δ pak1Δ* double mutant revealed that *PAK1* is necessary for complete WT-like repair. The epistatic interaction of both mutant alleles in the double mutant suggests that Pak1p

has a role in the same repair pathway to which *PSO2* belongs and that *PAK1* indeed is a repair gene.

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUÇÃO**



## 1. INTRODUÇÃO

Em 1953, James Watson e Francis Crick decifraram a estrutura do ácido desoxirribonucleico (DNA), o componente químico informacionalmente ativo de quase todos os acervos genéticos (à exceção do RNA de vírus e de viróides). Foi surpreendente também, descobrir-se que a estrutura primária do DNA é muito dinâmica e alvo de constantes mudanças na química e seqüência dos nucleotídeos. Muitas destas alterações surgem em consequência de erros introduzidos durante eventos celulares como a replicação, recombinação e pela própria reparação, ou resultantes da instabilidade inerente às ligações químicas presentes na molécula. Acrescenta-se a isto a grande reatividade do DNA de células vivas a vários agentes químicos e físicos, muitos dos quais presentes no ambiente, seja como produtos do metabolismo, seja como decomposição de outros organismos ou, ainda, produzidos industrialmente. Qualquer modificação na estrutura molecular do DNA pode interferir no seu metabolismo e função, incluindo replicação, transcrição e recombinação, tanto quanto em outras funções celulares importantes, tais como regulação do ciclo celular e/ou divisão celular (para revisão, ver Friedberg *et al.*, 1995; Taylor e Lehmann, 1998; Resnick e Cox, 2000).

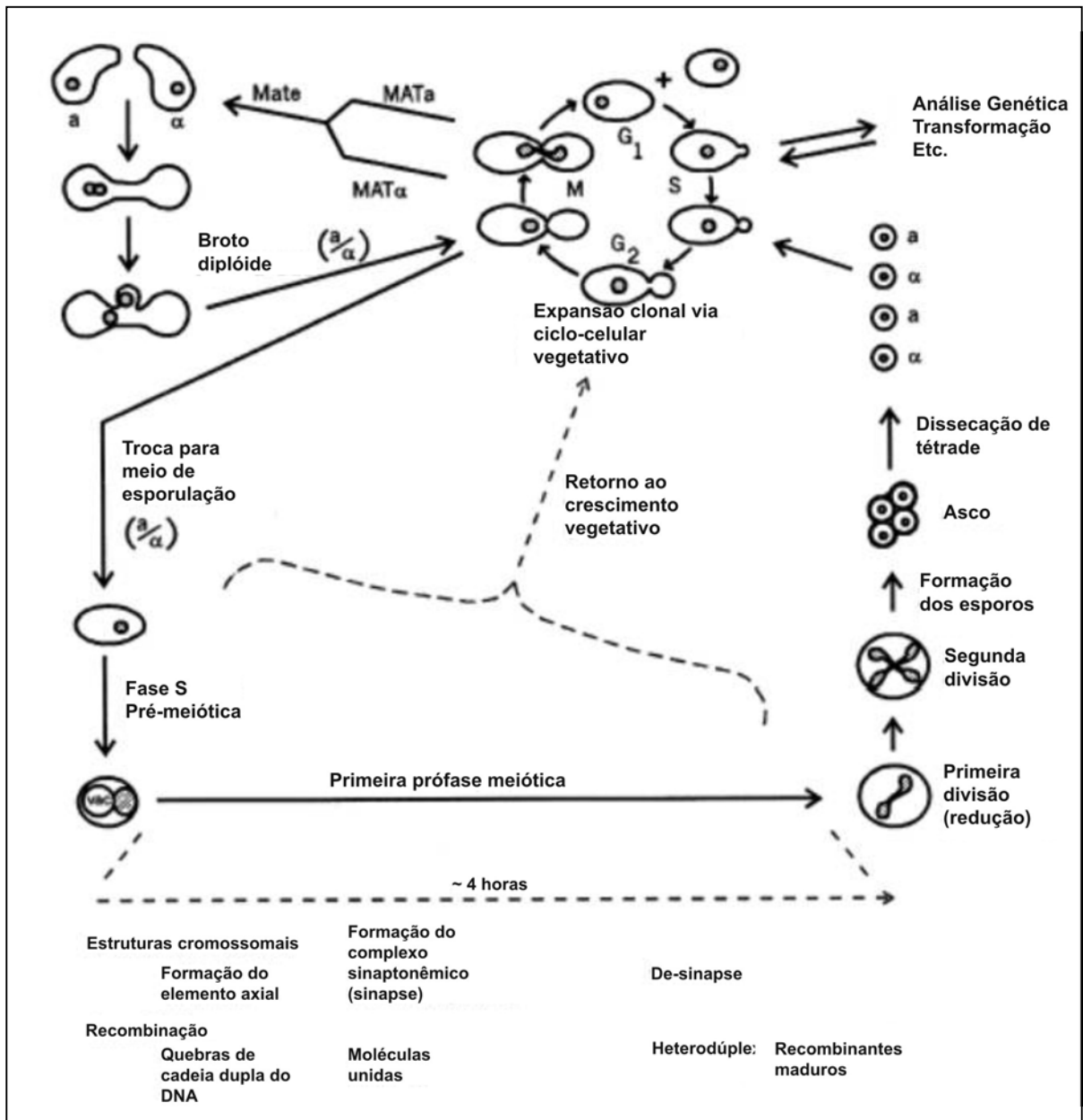
A fim de garantir a integridade do genoma e a sobrevivência das células através de sucessivas divisões celulares, com o passar do tempo os seres vivos desenvolveram mecanismos de proteção e reparação aos possíveis danos causados a esta macromolécula. Vários mecanismos de reparação celular, envolvendo etapas multienzimáticas, são capazes de remover rapidamente diferentes tipos de lesões produzidas no DNA de acordo com a natureza química do agente genotóxico (Taylor e Lehmann, 1998). Estas lesões, se não forem reparadas ou o forem de maneira incorreta, podem trazer sérias conseqüências, resultando em infidelidade na replicação, mutações, aumentando o risco de um indivíduo a sofrer várias doenças degenerativas. Gerada pela infidelidade na reparação de lesões no DNA, a instabilidade genômica pode permitir alterações genéticas relevantes para o desenvolvimento do câncer. Progressos na compreensão dos mecanismos de reparação do DNA estão sendo alcançados em diversos organismos, especialmente com células de mamíferos, e leveduras continuam sendo um excelente modelo para o estudo da reparação em humanos. Quase todas as vias de reparação, e a maioria dos *loci* individuais são significativamente homólogos desde leveduras até mamíferos (para revisão ver Taylor e Lehmann, 1998 e Resnick e Cox, 2000).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo eucariótico mais estudado e de melhor aplicação para o entendimento de diversas funções biológicas (Hieter, 1998; Resnick e Cox, 2000). A seqüência completa de seu genoma mostrou-se extremamente importante como referência 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, completo e bem definido (Figura 1). A capacidade desta levedura de replicar-se tanto em estado diplóide como em estado haplóide e a facilidade de obter-se mutantes faz deste organismo um dos modelos eucarióticos melhor caracterizados geneticamente quanto à resposta celular aos danos provocados no DNA. Métodos de alta eficiência de transformação em levedura estão disponíveis há mais de uma década, possibilitando a clonagem de genes por complementação genética. O eficiente sistema de recombinação homóloga presente nas leveduras permite que seqüências alteradas em genes clonados possam ser introduzidas novamente no cromossomo, na região homóloga correspondente. Isto permite a rápida identificação de conseqüências fenotípicas de mutações em qualquer gene clonado, técnica esta geralmente não disponível para eucariotos superiores (Ausubel *et al.*, 1995; Burke *et al.*, 2000). O fato de muitos processos celulares serem fisiologicamente conservados entre diferentes espécies de eucariotos, combinado às potentes ferramentas genéticas e moleculares disponíveis para *S. cerevisiae*, têm feito desta levedura um valioso sistema modelo, permitindo sua utilização para convenientemente analisar e funcionalmente dissecar produtos de genes de outros eucariotos (Taylor e Lehmann, 1998 e Resnick e Cox, 2000).

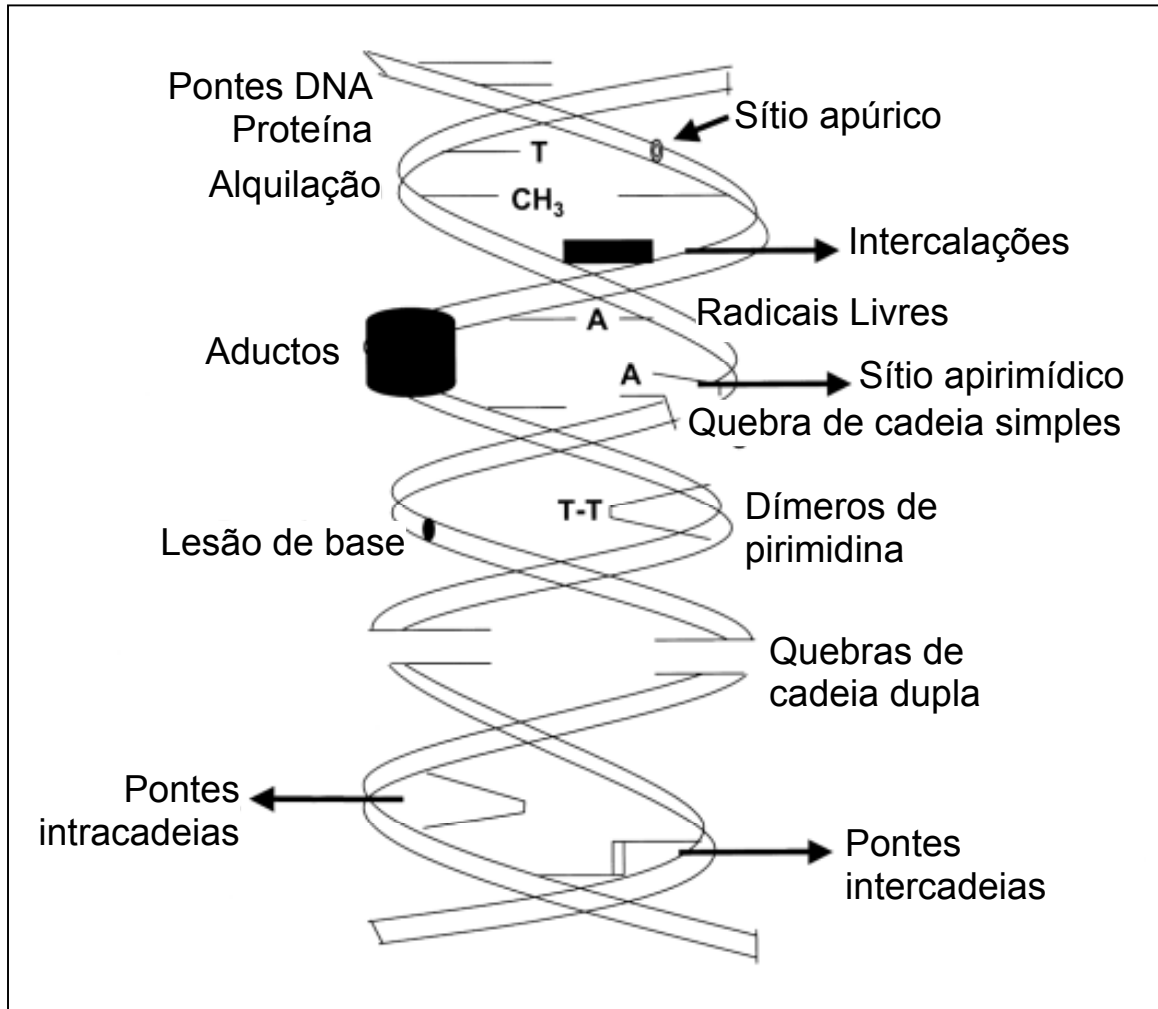
## **1.1. Agentes que lesionam a célula**

### **1.1.1. Radiação ultra-violeta**

As células, tanto de um microrganismo unicelular quanto de metazoários, enfrentam ao longo de suas vidas várias formas de dano ao DNA expondo-se a muitos agentes endógenos e exógenos. Algumas das lesões mais comuns induzidas no DNA genômico por diferentes agentes danosos ao DNA são mostrados na Figura 2.

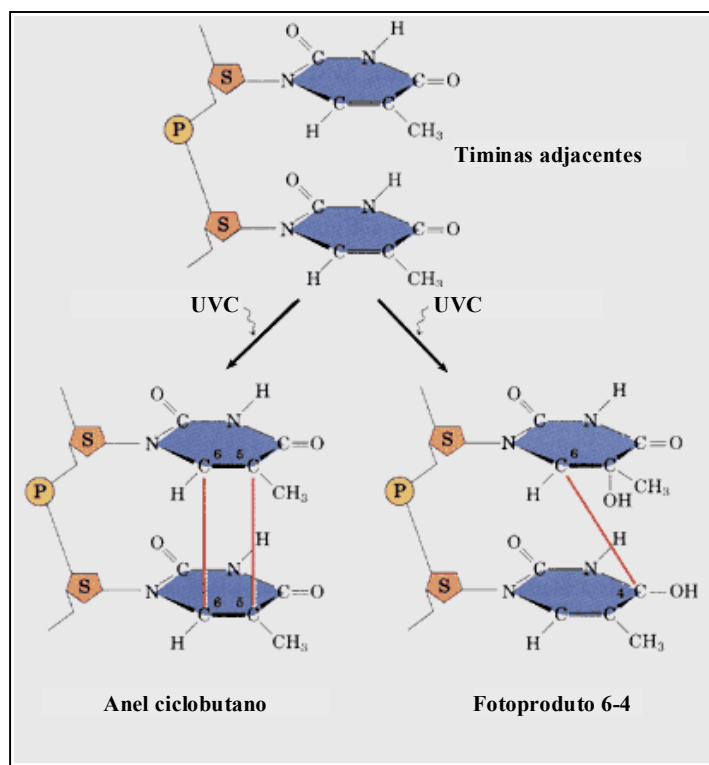


**Figura 1.** Ciclo de vida da levedura *S. cerevisiae*. Células haplóides de sinais de acasalamento diferentes ( $MATa$  e  $MAT\alpha$ ) podem formar células diplóides, capazes de esporular (meiose) e retornar ao crescimento vegetativo haplóide, permitindo análise genética da segregação. As etapas principais da prófase meiótica estão listadas na parte inferior da figura. Modificado de Dresser *et al.* (2000).



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

A radiação UV foi o primeiro e ainda é o mais bem estudado agente capaz de provocar danos e por consequência induzir a reparação do DNA. O espectro da radiação ultravioleta (UV) está dividido em três bandas: UVA (400-320nm), UVB (320-290nm) e UVC (290-100nm). Embora a maior parte dos estudos baseia-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 3).



**Figura 3.** Representação esquemática de um anel ciclobutano entre duas timinas na mesma cadeia de DNA e um fotoproduto 6-4, produzido pela ligação entre o C6 de uma timina e o C4 da timina adjacente (Modificado de [www.cpmcnet.columbia.edu](http://www.cpmcnet.columbia.edu)).

A exposição do DNA à radiação de comprimento de onda curto (UV<sub>254nm</sub> ou UVC) promove a ligação covalente entre as bases pirimídicas adjacentes, formando uma estrutura anelar de ciclobutano chamada dímero de pirimidina, CPD, ou ainda, dipirimidina ciclobutano, resultante da saturação dos carbonos C4 e C5. 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. A formação de dímeros de pirimidinas é mais freqüente entre as timinas do que entre as citosinas, sendo quase 70% T-T, 15%T-C e 3% C-C (Friedberg *et al.*, 1995). CPDs provocam grandes distorções na hélice de DNA, levando a 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. A dupla ligação da pirimidina 5' abre-se e reage com o grupo exocíclico da pirimidina 3' (Friedberg *et al.*, 1995), gerando maior distorção na estrutura do DNA (Taylor *et al.*, 1988). São lesões alcali-lábeis (Lippke *et al.*, 1981). Essa ligação ocorre mais freqüentemente entre as citosinas (T-C, C-C) do que entre as timinas (T-T), porém não entre C-T. A metilação da citosina na posição C-5 aparentemente inibe a formação de fotoprodutos 6-4 (Friedberg *et al.*, 1995).

### **1.1.2 UV-mimético: óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO)**

O 4-NQO é um potente agente carcinogênico, porém a espécie reativa responsável por essa ação é o produto de sua metabolização. O 4-NQO é convertido em óxido de 4-hidroxi-aminoquinolina (4HAQO) e, finalmente, em óxido de 4-aminoquinolina (4AQO) que serve comoceptor final de hidrogênio (Friedberg *et al.*, 1995).

O 4-NQO é considerado um agente químico UV-mimético porque produz lesões de bases que, da mesma forma que os CPDs e 6-4 fotoprodutos, são reparados pelo sistema de reparação por excisão de nucleotídeos (NER). É capaz de formar lesões do tipo 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OH-dG), e de gerar uma quantidade significativa de quebras de fita de DNA, provavelmente pela formação de adutos instáveis (Friedberg *et al.*, 1995).

### 1.1.3 Agentes alquilantes

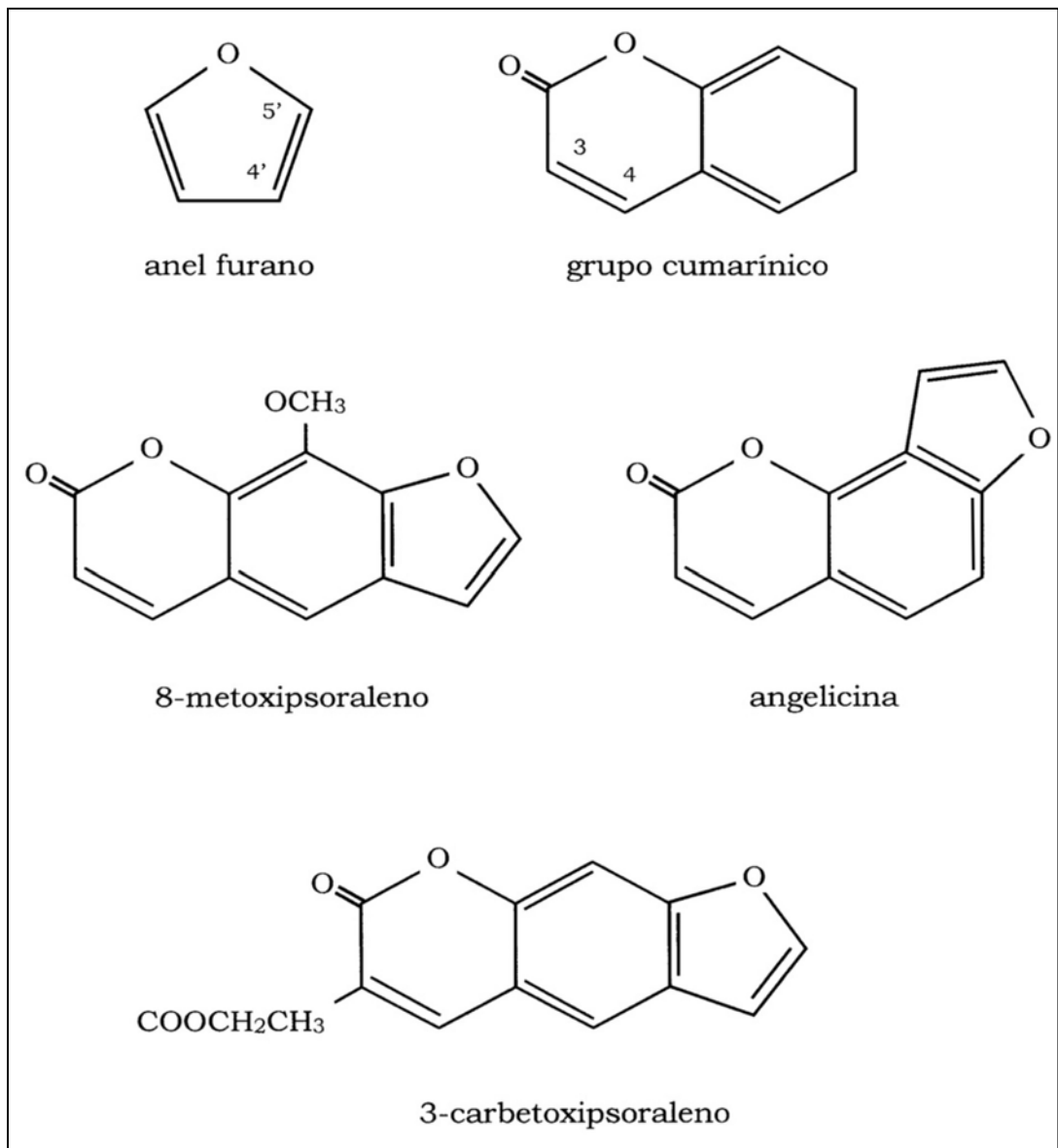
Agentes alquilantes são compostos eletrofílicos capazes de interagir covalentemente com centros nucleofílicos de moléculas orgânicas, como DNA. Podem ser mono ou bifuncionais. Os agentes monofuncionais possuem um único grupo reativo e, portanto, interagem covalentemente com um único centro nucleofílico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

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

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

### 1.1.4. Psoralenos/Furocumarinas

As furocumarinas, ou psoralenos são compostos aromáticos tricíclicos de origem natural como o 8-metoxipsoraleno (8-MOP), ou sintética como o 3-carbetoxipsoraleno (3-CPs), formados a partir da condensação do núcleo cumarínico (benzo- $\alpha$ -pirona ou 1,2-benzopirona) com o grupo furano (Averbeck *et al.*, 1992; Gasparro *et al.*, 1998) ( Figura 4). Os psoralenos intercalam-se entre os pares de bases do DNA de maneira reversível através de ligações químicas de natureza fraca, como forças de



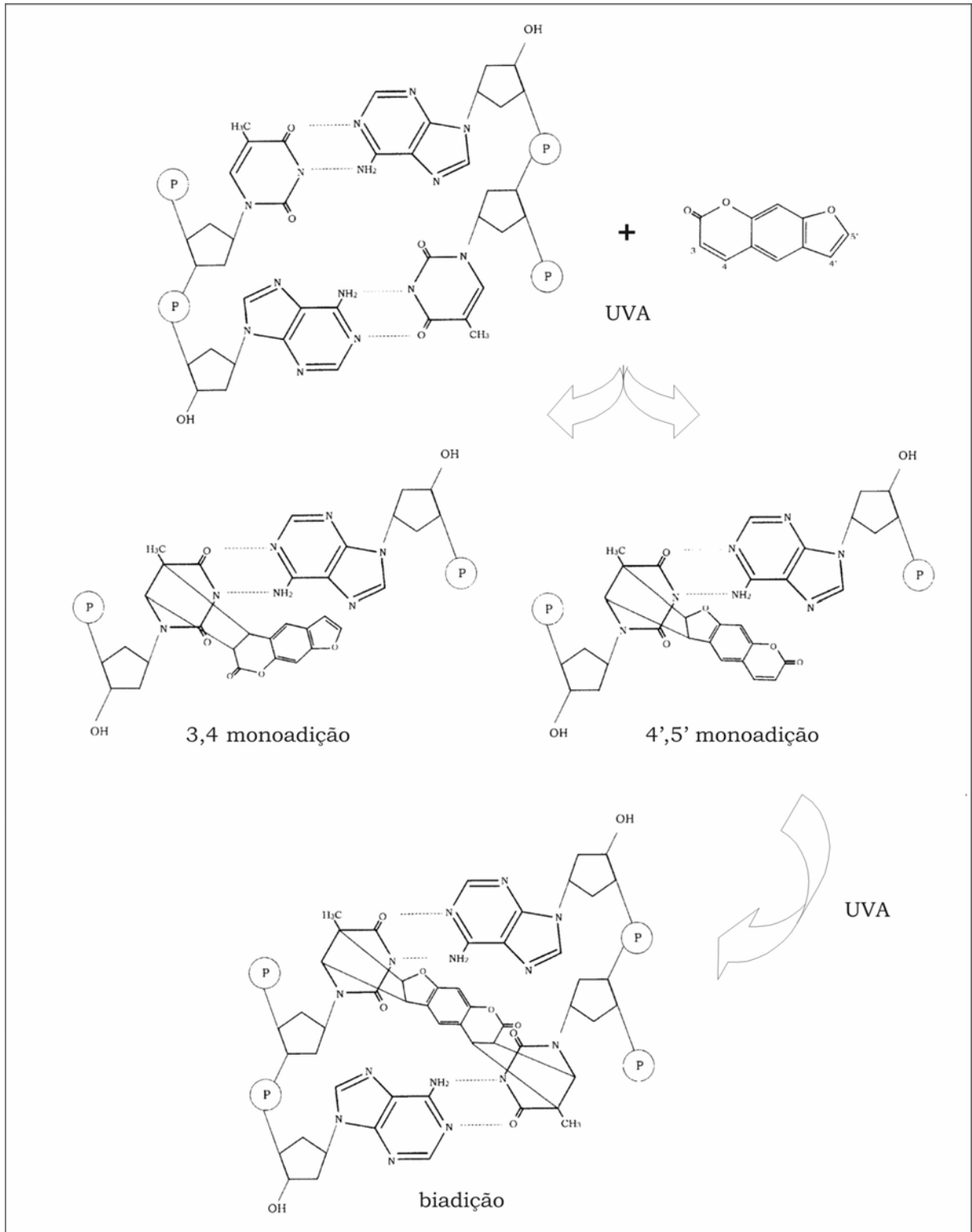
**Figura 4 .** Estrutura molecular das furocumarinas e alguns derivados.



Van der Waals e pontes de hidrogênio. Na presença de luz UV de 365nm (UVA), adicionam-se às bases pirimídicas, principalmente timinas, através de ligações covalentes, formando adutos. Estas fotoadições podem ocorrer na forma de mono ou biadições, dependendo da estrutura molecular da furocumarina.

Nas monoadições, a dupla ligação C5-C6 da base pirimídica liga-se à dupla ligação C3-C4 do núcleo cumarínico (monoadições do tipo 3,4) ou à dupla ligação C4-C5 do grupo furano (monoadições do tipo 4',5') (Figura 5). 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 (*Interstrand Cross Links*, ICLs). Furocumarinas que possuem tanto o sítio C3-C4 do anel cumarínico como o C4-C5 do anel furano disponíveis e apresentam uma conformação planar podem formar tanto monoadições quanto biadições, sendo denominadas bi-funcionais, como os agentes 8-MOP e TMP (4, 5', 8 trimetoxipsoraleno). Por outro lado, moléculas angulares ou com algum impedimento estérico num dos sítios fotorreativos poderão formar somente monoadições. Exemplos desses agentes, denominados monofuncionais, são o 3-CPs e a Angelicina (Averbeck, 1984; Averbeck *et al.*, 1992).

Através dessas fotoadições, as furocumarinas podem causar diversos efeitos genotóxicos, resultando em letalidade, mutagênese e recombinação, em procariotos e eucariotos (Parsons, 1980; Moustacchi *et al.*, 1983; Moustacchi, 1988; Averbeck *et al.*, 1992). Foi demonstrado, entretanto, que as furocumarinas fotoativadas, especialmente o 3-CPs, podem também transferir energia para moléculas aceptoras, originando agentes fotodinamicamente ativos. Desta forma, a transferência de energia das moléculas de furocumarinas no estado excitado triplete para o oxigênio molecular origina uma espécie excitada mais reativa, o oxigênio *singlet*, que oxida as bases púricas do DNA, principalmente as guaninas (Averbeck, 1989; Sage *et al.*, 1989; Averbeck *et al.*, 1992).



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

## 1.2. Vias de reparação do DNA

O estudo dos mecanismos de reparação de lesões no DNA de leveduras iniciou com o isolamento de uma série de mutantes sensíveis aos efeitos das radiações UVC (radiação ultravioleta curta, 254nm) e ionizantes, chamados mutantes *rad* (Game e Cox, 1971; Game e Mortimer, 1974), ao metilmetano sulfonato, mutantes *mms* (Prakash e Prakash, 1977), à fotoadição de psoralenos e ou furocomarinas, mutantes *psa* (Henriques e Moustacchi, 1980) e às mostardas nitrogenadas, mutantes *snm* (Ruhland *et al.*, 1981). Adicionalmente, foram caracterizados mutantes que apresentaram uma redução na taxa de mutações induzidas pela radiação UVC, os mutantes *rev* (Lemontt, 1971) que podem também ser defectivos na recombinação meiótica ou mitótica após tratamento com radiação UVC ou raios X (Rodarte-Ramon e Mortimer, 1972). O grande número de genes identificados e o isolamento de outros mutantes sugeriram a presença de múltiplas vias para a reparação de lesões induzidas por radiações. O estudo de alelismo entre simples mutantes sensíveis às radiações, bem como das interações de epistasia e sinergismo entre duplos e triplos mutantes estabeleceram três grupos de epistasia de genes de reparação de lesões (Game e Cox, 1971; 1972; Brendel e Haynes, 1973; Game e Mortimer, 1974), os quais correspondem às três principais respostas celulares referentes aos danos no DNA (Tabela 1): reparação por excisão de nucleotídeos, via **RAD3**, também conhecida por NER (*nucleotide excision repair*), reparação por recombinação ou reparação de quebras de cadeia de DNA, via **RAD52** e reparação pós-replicativa e/ou mutagênica, via **RAD6** (para revisão, ver Friedberg *et al.*, 1995; Nickoloff e Hoekstra, 1998; Prakash e Prakash, 2000; Game, 2000; Kupiec, 2000).

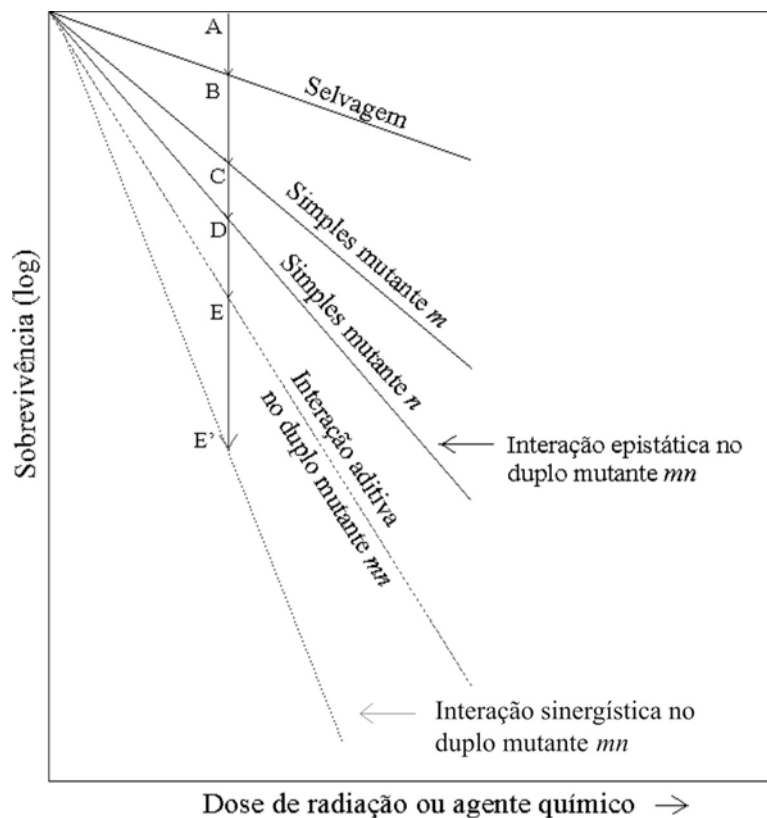
As interações gênicas entre os genes envolvidos na reparação do DNA são definidas de acordo com a resposta que as linhagens mutantes apresentam em relação a um determinado agente genotóxico (Figura 6). Quando um duplo mutante é construído de simples mutantes pertencentes ao mesmo grupo de epistasia, ele não deve ser mais sensível ao agente do que o mais sensível dos simples mutantes. Isso indica que estes dois genes estão envolvidos em etapas seqüenciais de uma rota bioquímica ou, então, que fazem parte de um complexo multimérico ou multiproteico. Entretanto, quando os simples mutantes pertencem a grupos epistáticos distintos e competem pelo mesmo tipo de lesão, a dupla mutação resulta em uma sensibilidade aumentada, chamada sinérgica. Um terceiro tipo de interação pode ser identificado quando o duplo mutante apresenta uma sensibilidade que

corresponde à soma das sensibilidades dos simples mutantes. Esta é a interação dita aditiva e ocorre quando cada mutação bloqueia uma via diferente de reparação, mas não competem pelo mesmo substrato (para revisão, ver Brendel e Haynes, 1973; Henriques e Moustacchi, 1981; Henriques e Brendel, 1990; Friedberg *et al.*, 1995; Henriques *et al.*, 1997; Game, 2000). Os grupos de epistasia dos genes envolvidos no processo de reparação são mostrados na Tabela 1. A Figura 6 ilustra as três diferentes situações de interações gênicas possíveis entre genes envolvidos na reparação do DNA. Os estudos das relações de epistasia entre mutantes de genes de reparação do DNA, mostraram que os três principais grupos de epistasia não são completamente independentes, ao contrário, ocorrem várias sobreposições demonstradas pela presença de alguns genes em mais de um desses grupos (Henriques e Brendel, 1990; Friedberg *et al.*, 1995; Henriques *et al.*, 1997; Game, 2000)..

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

<b>Grupo RAD3</b>	<b>Grupo RAD6</b>	<b>Grupo RAD52</b>
<i>RAD1</i>	<i>RAD5 (REV2) (SNM2)</i>	<i>RAD50</i>
<i>RAD2</i>	<i>RAD6 (UBC2) (PSO8)</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>		
<i>POL30</i>		

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



**Figura 6.** Representação gráfica dos três tipos básicos de interações gênicas que são possíveis em linhagens duplo mutantes em *loci* que participam de processos de reparação do DNA. O duplo mutante *mn*, se houver interação epistática entre os genes, não deverá ser mais sensível do que o mais sensível simples mutante *n*; se a interação dos dois genes aumenta a sensibilidade do duplo mutante de modo a torná-lo mais sensível que o simples mutante *n*, pode-se ter uma interação aditiva (onde  $AE=AC+BD$ ) ou uma interação sinérgica (onde  $AE' > AE$ ).

### 1.2.1 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 (para revisão Prakash e Prakash, 2000), como por exemplo danos induzidos pela radiação UVC, e pontes intra e intercadeias de DNA (Braithwaite *et al.*, 1999; Prakash e Prakash, 2000). A via NER compreende uma série de reações enzimáticas necessárias para remover lesões no DNA, iniciando pela etapa de reconhecimento da lesão onde diversas proteínas ligam-se ao DNA lesado, fazem duas incisões na fita simples (3' e 5' ao dano) e removem o fragmento de oligonucleotídeos contendo a lesão, cujo tamanho geralmente é fixo e independente da

natureza do dano (Prakash e Prakash, 2000). Posteriormente, a DNA polimerase, DNA ligase e outras proteínas preenchem a lacuna deixada para regenerar uma fita de DNA intacta (Friedberg *et al.*, 1995; Nickoloff e Hoekstra, 1998; Braithwaite *et al.*, 1999). Este esquema básico, é bastante conservado evolutivamente e parece ser o mesmo para *Escherichia coli*, mamíferos e leveduras (Sweder, 1994; Friedberg *et al.*, 1995;; Wood, 1997; Braithwaite *et al.*, 1999; Benhamou e Sarasin, 2000; Prakash e Prakash, 2000). Em humanos, um defeito na via NER resulta em doenças como Xeroderma Pigmentosum (XP), Síndrome de Cockayne (CS) e Tricodistrofia ou PIBIS. Indivíduos XP são extremamente sensíveis à radiação UVC 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).

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

A NER está subdividida em duas vias, parcialmente sobrepostas, uma é especializada na reparação de fitas transcritas de genes ativos chamada de reparação acoplada à transcrição (TCR), e a outra está 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; Prakash e Prakash, 2000). A velocidade de atuação da 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 da TCR tem sido documentada em *E. 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).

### 1.2.2 Reparação pós-replicativa e/ou mutagênica

A via de reparação pós-replicativa e/ou mutagênica é responsável pela tolerância celular a uma variedade de lesões que bloqueiam a replicação do 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 preenchida 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 Averbeck *et al.*, 1992; Nickoloff e Hoekstra, 1998; Game, 2000; Lawrence, 2000; Kunz *et al.*, 2000), apresentando uma redução ou bloqueio na mutagênese induzida por diversos agentes (Lawrence, 1994; Nickoloff e Hoekstra, 1998; Lawrence *et al.*, 2000; Game, 2000). Alguns são defectivos em reparação pós-replicativa de DNA, presumidamente devido a um fracasso ou a uma falha para fechar as lacunas no DNA fita simples no lado oposto à lesão (Bailly *et al.*, 1997; Nickoloff e Hoekstra, 1998).

O grupo caracteriza-se pela sua complexidade, a qual resulta nas diferenças fenotípicas apresentadas pelos seus mutantes. Mutantes *rad6* apresentam deficiência na reparação pós-replicativa e acentuada diminuição da mutagênese após tratamento com vários agentes que causam danos no DNA (Prakash, 1974; 1981; Lawrence, 1982; Prakash *et al.*, 1993), independente do tipo de dano ou do *locus* da mutação observada, com exceção da mutagênese do DNA mitocondrial (Friedberg *et al.*, 1995). São extremamente sensíveis à radiação UVC, raios  $\gamma$ , agentes alquilantes, psoralenos fotoativados e a vários agentes químicos (Prakash *et al.*, 1989; Koken *et al.*, 1991; Henriques e Brendel, 1990; Henriques *et al.*, 1997; Nickoloff e Hoekstra, 1998). Além disso, mutantes *rev* possuem diferentes graus de bloqueio na mutagênese induzida, dependendo do alelo (Prakash *et al.*, 1993).

Xiao *et al.* (2000) relataram um grande número de evidências sugerindo 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). Os mutantes *rev* da via mutagênica foram inicialmente isolados por apresentarem uma frequência extremamente reduzida em mutagênese induzida após tratamento com UVC (Lemontt, 1971; 1972). Os genes *REV1*, *REV3* e *REV7* são requeridos para a mutagênese induzida por radiação UVC, enquanto *RAD5*, *RAD30*, *POL30* e *MMS2* fazem parte da via alternativa livre de erro para a síntese de lesões no DNA induzidas por UV (Johnson *et al.*, 1999a; Kunz *et al.*, 2000). Pertencente a via livre de erros, o gene *RAD30* codifica a DNA polimerase Pol  $\eta$ , homóloga ao gene DinB, UmuC de *E. coli*, e *REV1* de *S. cerevisiae* (Roush *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1999b). A Pol  $\eta$ , distinta das polimerases  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  e  $\gamma$ , catalisa a síntese livre de erro sintetizando dímeros de timina com alta fidelidade (Johnson *et al.*, 1999b). *In vitro*, esta polimerase sintetiza eficientemente danos do tipo TT CPD (*bypass*), inserindo uma adenina oposta a cada timina, uma lesão que normalmente bloqueia a DNA polimerase (Johnson *et al.*, 1999b; Kunz *et al.*, 2000; Prakash *et al.*, 2000). Mutações em seu homólogo em humanos hRAD30 foram encontradas em pacientes com variantes XP (Johnson *et al.*, 1999b; Masutani *et al.*, 1999), cujas células apresentam defeitos na atividade da Pol  $\eta$  (Masutani *et al.*, 1999; Hübscher *et al.*, 2000; Game, 2000; Prakash *et al.*, 2000).

### 1.2.3 Reparação de DNA por recombinação homóloga

Existem muitas evidências de que a tolerância aos danos no DNA, associada aos mecanismos recombinacionais, é iniciada por quebras de cadeias. Quebras de cadeias duplas ou *double strand breaks* (DSBs) são uma importante forma de danos no DNA que, se mal reparadas, podem resultar em deleções mutagênicas, rearranjos ou translocações, (Parshad e Sanford, 2001) e, se não reparadas, podem levar a perdas de cromossomos e morte celular (Friedberg *et al.*, 1995; Nickoloff e Hoekstra, 1998). 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).

A reparação de lesões na simples fita de DNA de leveduras é realizada utilizando imediatamente a fita complementar acessível como modelo, mas isso não é possível para DSBs, que podem ser reparadas pela ligação direta das extremidades 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; Pâques e Haber, 1999). Genes envolvidos em vias recombinacionais são conservados entre eucariotos superiores e inferiores, refletindo também na semelhança dos mecanismos recombinacionais (Pâques e Haber, 1999).

Em *S. cerevisiae*, há pelo menos doze genes envolvidos na reparação recombinacional de quebras de cadeia dupla, os quais constituem a via *RAD52* de epistasia e inclui os genes *RAD50* à *RAD57*, *RAD59*, *MRE2*, *MRE11* e *XRS2* (Game 1993, Heywer e Kolodner 1993, Friedberg *et al.*, 1995, Nickoloff e Hoekstra 1998, Kannar *et al.*, 1998). A maioria destes genes está implicada não só em recombinação mitótica, mas também meiótica, a qual é iniciada pela formação e subsequente pela reparação de quebras de cadeias duplas (Pâques e Haber, 1999). Linhagens defectivas em qualquer um destes genes são extremamente sensíveis à radiação ionizante. Há também outros genes cujos produtos não atuam diretamente na reparação de quebras duplas, mas têm uma função no processo recombinacional, como por exemplo o *CDC1*, envolvido com o ciclo de divisão celular (Ramotar e Masson 1996). Para alguns desses genes da via *RAD52*, como *RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54* e *MRE11* já foram identificados homólogos em camundongos e humanos (Shinohara *et al.*, 1993, Muris *et al.* 1994, Kanaar *et al.*, 1996, Dolganov 1996, Kannar *et al.*, 1998). Na levedura, a proteína RPA, a qual se liga a fita simples de DNA e é codificada pelos genes *RFA*, também participa da reparação de quebras de cadeias duplas e ativa reações de troca de cadeia (Wood, 1996).

Ensaio bioquímico e utilizando o sistema dois-híbridos (ver Anexo 1) mostraram que as proteínas Rad50, Xsr2 e Mre11 interagem umas com as outras. Sugere-se que as mesmas atuem juntas na etapa inicial da reparação das quebras de cadeias duplas do DNA necessárias para que haja recombinação meiótica (Johzuka e Ogawa 1995, Ogawa *et al.*, 1995, Kannar *et al.*, 1998). Postula-se que o complexo Mre11/Rad50 ligue-se aos sítios

expostos da cromatina a fim de reprimir a produção de lesões recombinogênicas espontâneas e há estudos mostrando que Mre11, Rad50 e Xrs2 constituem a atividade de exonuclease 5'-3' no processamento das quebras duplas de DNA durante a mitose (Johzuka e Ogawa 1995, Ramotar e Masson, 1996).

A proteína Rad51 liga-se ao DNA numa reação dependente de ATP e possui grande homologia com a proteína RecA de *E. coli*, atuando de forma similar a esta na formação de nucleofilamentos helicoidianos sobre o DNA (Shinohara *et al.*, 1992). A proteína Rad51 interage com Rad52 (Milne e Weaver 1993), assim como seus homólogos em humanos (Shen *et al.*, 1996). Estudos utilizando o sistema dois-híbridos mostraram que a proteína Rad51 também pode interagir com Rad54 (Clever *et al.*, 1997) e Rad55, sendo que este último está associado com Rad57. (Hays *et al.*, 1995). Sendo assim, há pelo menos cinco proteínas, Rad51, Rad52, Rad54, Rad55 e Rad57, formando um complexo multiproteico na reparação recombinacional em *S. cerevisiae*, denominado "recombinossoma" (Hays *et al.*, 1995, Ramotar e Masson, 1996).

No grupo de epistasia RAD52, os mutantes *rad52* são os que apresentam os defeitos mais severos na reparação de DSBs e recombinação, sugerindo que este gene atue de forma bastante significativa neste processo. Esses mutantes são bastante sensíveis à radiação ionizante (Game, 2000) e praticamente bloqueados em recombinação meiótica e esporulação (Game, 2000). Apesar do gene *RAD52* não possuir homologia significativa com os genes envolvidos em recombinação em *E. coli*, ele é bastante conservado em levedura, humanos e camundongos (Muris *et al.*, 1994, Park 1995, Nickoloff e Hoeckstra 1998, Kannar *et al.*, 1998; Kupiec, 2000), sugerindo que a proteína Rad52 deve ser única para todos os organismos eucarióticos.

#### 1.2.4 Reparação de DNA por recombinação não-homóloga ou ilegítima

A levedura *S. cerevisiae* é bastante eficiente em processos de recombinação homóloga. Entretanto, ela possui também um percentual baixo de recombinação não-homóloga, principalmente quando a via **RAD52** não está atuando. Em 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 deste complexo denominada DNA-PKcs (uma proteína de 465kDa) (Smith e Jackson, 1999).

Em *S. cerevisiae*, ainda não foi descrita nenhuma subunidade catalítica da proteína quinase dependentede DNA (Game, 2000) . Entretanto, existe um heterodímero homólogo de Ku, chamado de Hdf ou yKu, a qual possui também uma grande afinidade por DNA (Feldmann e Winnacker, 1993). Os genes que codificam para as duas subunidades (de 70 e 80 kDa) foram clonados pela sua alta afinidade de ligação à extremidades de DNA livres (do inglês: *high affinity DNA-binding factor* - *HDF*) e foram denominadas de *HDF1* e *HDF2*, respectivamente ou y-Ku70 e y-Ku80 (Feldamann e Winnaker, 1993, Feldmann *et al.*, 1996). Fenótipos de seus respectivos mutantes também foram associados à reparação de DNA e recombinação ilegítima em *S. cerevisiae* (Feldmann *et al.*, 1996; Smith e Jackson, 1999).

A formação de 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 à 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-PK<sub>CS</sub> causa uma mudança estrutural neste complexo, desmontando-o (Chan *et al.*, 1996). 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).

### **1.3 Os mutantes *PSO***

Em 1980, Henriques e Moustacchi isolaram, a partir de uma população de células mutagenizada com EMS, uma nova classe de mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* sensíveis à fotoadição de psoralenos mono- (3-CPs) e bi-funcionais (8-MOP): os mutantes *pso*. A análise molecular desses genes e a caracterização fenotípica de seus alelos mutantes têm progredido consideravelmente. Atualmente, dez genes *PSO* estão

caracterizados fenotipicamente; destes, seis genes codificam proteínas que estão envolvidas na reparação de lesões no DNA geradas pela fotoativação de psoralenos e por outros mutágenos. Dois genes não estão envolvidos diretamente na reparação de lesões de DNA: o gene *PSO6* é responsável por elementos estruturais da membrana e o gene *PSO7* envolvido com o metabolismo respiratório celular. As características dos genes *PSO1* a *PSO10* estão apresentadas na Tabela 2 (para revisão, ver Henriques e Brendel, 1990; Henriques *et al.*, 1997; Brendel e Henriques, 2001).

O gene *PSO1* é alelo ao gene *REV3* (Cassier e Moustacchi, 1988). O produto do gene *REV3* codifica uma proteína não essencial de 173kDa, uma DNA polimerase específica de reparação (Morrison *et al.*, 1989) que, junto com *REV7*, constitui a polimerase translesão zeta (pol  $\zeta$ ), uma proteína responsável pela síntese translesão (TLS) sujeita a erro, que faz o *bypass* de dímeros de pirimidina (Nelson *et al.*, 1996). A atividade da pol  $\zeta$  é controlada pela pRev1, então a perda da função de um ou outro destes três *loci* *REV* inibe a TLS sujeita a erro, portanto a mutagênese induzida por UVC (Lawrence e Hinkle, 1996; Brendel e Henriques, 2001). O alelo mutante *rev3* foi isolado por Lemontt (1971), entre outros mutantes de levedura bloqueados em mutação induzida por UVC (Lemontt, 1971; Brendel e Henriques, 2001). O mutante *psol/rev3* é sensível a uma série de agentes genotóxicos como radiação UVC, raios X, agentes alquilantes mono e bi-funcionais e psoralenos fotoativados (Moustacchi, 1988; Henriques e Brendel, 1990; Henriques *et al.*, 1997; Brendel e Henriques, 2001), sua frequência de mutação reversa espontânea e induzida é extremamente reduzida, apresentando um fenótipo antimutador (Cassier *et al.*, 1980; Henriques *et al.*, 1997).

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

Gene/Alelo	Proteína (kDa)/Função	Fenótipo do mutante
<i>PSO1/REV3</i>	173; polimerase translesão (Polζ)	sensível à radiação e a agentes genotóxicos químicos; baixa mutabilidade
<i>PSO2/SNMI</i>	72; desconhecida	sensível ao tratamento com todos os agentes indutores de pontes
<i>PSO3/RNR4</i>	40,1; 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	sensível à UVC e lesões oxidativas
<i>PSO6/ERG3</i>	43; ergosterol desaturase	sensível a danos oxidativos
<i>PSO7/COX11</i>	28; associa-se ao complexo citocromo-oxidase	células sensíveis à 4-NQO
<i>PSO8/RAD6</i>	19,5; enzima conjugada a ubiquitina	sensível à UVC e a vários agentes mutagênicos; mutagênese reduzida
<i>PSO9/MEC3</i>	53,1; controle espec. de <i>checkpoint</i> em resposta a danos no DNA na fase G2	sensível a vários agentes genotóxicos; mutagênese reduzida;
<i>PSO10</i>	Desconhecida	sensível a vários agentes genotóxicos; mutagênese reduzida bloqueado em esporulação

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

O mutante *pso3-1* apresenta sensibilidade ao tratamento com psoralenos mono e bi-funcionais, é levemente sensível à radiação UVC, à mostardas nitrogenadas mono e bi-funcionais e, embora não afete a resistência a agentes alquilantes e à radiação gama, este mutante mostra fenótipos de redução na mutagênese induzida por tais agentes e defeitos em recombinação mitótica espontânea e induzida, especialmente em conversão gênica

(Cassier *et al.*, 1980; Moustacchi *et al.*, 1983; Andrade *et al.*, 1989; Henriques e Brendel, 1990; Henriques *et al.*, 1997). Estudos realizados através de interação gênica com os mutantes *rad* revelaram uma interação epistática do mutante *pso3-1* com *rad3* e *pso2-1*, indicando sua alocação no grupo de epistasia RAD3 (Benfato *et al.*, 1992).

A sensibilidade do mutante *pso3-1* ao ânion superóxido gerado pelo paraquat, à  $H_2O_2$ , à cloreto de cádmio e ao formaldeído sugere que este gene participe da reparação de lesões produzidas por estresse oxidativo (Henriques *et al.*, 1997; Brendel *et al.*, 1998; Brosmanova *et al.*, 2001). Entretanto, Brendel *et al.*, (1998), mostraram que alguns fenótipos relacionados ao mutante *pso3-1* eram atribuídos aos baixos níveis de glutathiona (GSH) na célula do mutante original e na linhagem selvagem N123, da qual todos os mutantes *pso*, com exceção do *pso4-1*, foram derivados. O gene *GSH1* codifica a enzima  $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetase, a qual é requerida no primeiro passo da biossíntese de glutathiona. Os fenótipos de resistência a MNNG, sensibilidade a cádmio e formaldeído, bem como a instabilidade das mitocôndrias foram complementados quando o mutante *pso3-1/gsh1-leaky* foi transformado com gene *GSH1*. Entretanto, a sensibilidade para UVC, a psoralenos fotoativados, a paraquat e a peróxido de hidrogênio, e a redução das taxas de mutagênese induzidas por UVC foram mantidas (Brendel *et al.*, 1998).

O gene *PSO5* mostrou-se alélico ao gene *RAD16* (Paesi-Toresan *et al.*, 1995) o qual tem função na reparação do genoma global de leveduras, reparando preferencialmente CPDs induzidas por UV em cadeias não transcritas de DNA (*loci HML $\alpha$*  ou *HML $\alpha$* ) em regiões silenciosas do DNA, e fitas não transcritas de DNA de genes ativos (Bang *et al.*, 1992; Schild *et al.*, 1992; Verhage *et al.*, 1994). O gene *PSO5/RAD16* codifica uma proteína de 91,3 kDa e contém dois possíveis domínios dedos-de-zinco e várias outras regiões típicas de helicases que são também encontradas em outras proteínas de leveduras semelhantes a Snf2, Rad54 e Mot1 (Bang *et al.*, 1992; Schild *et al.*, 1992). A proteína codificada por este gene pertence à família *SNF2* de helicases. *RAD16* forma um complexo com *RAD7* chamado NEF-4 e liga-se ao DNA de maneira ATP dependente (Reed *et al.*, 1998; Guzder *et al.*, 1997; 1998; 1999; Prakash e Prakash, 2000). O mutante *pso5-1* caracteriza-se por apresentar sensibilidade moderada a UVC, UV-mimético 4-NQO, HN1 e HN2 (Querol *et al.*, 1994), apresenta sensibilidade cruzada ao psoraleno monofuncional 3-CPS+UVA e a outros agentes químicos que aumentam o estresse oxidativo da célula como  $H_2O_2$  e paraquat (Sage *et al.*, 1989; Averbeck *et al.*, 1992; Querol *et al.*, 1994). Estudos de interações protéicas utilizando o sistema díbrido mostraram que

a proteína Pso5/Rad16 interage com a proteína Sgs1 envolvida em envelhecimento (Saffi *et al.*, 2000, 2001). O produto do gene *SGSI* em humanos corresponde à síndrome de Werner, também conhecida como síndrome do envelhecimento precoce e síndrome de Bloom, com fenótipo de predisposição ao câncer (Watt *et al.*, 1995).

O gene *PSO6* é alelo ao gene *ERG3*, o qual codifica a enzima esteroil  $\Delta$ -5 desaturase, que introduz a dupla ligação C5=C6 durante a biossíntese do ergosterol (Schmidt *et al.*, 1999). O ergosterol é o esteroil mais abundante da membrana (90%) de leveduras (Thompson, 1974), em contraste a outras células eucarióticas que contêm colesterol como principal esteroil. A falta de ergosterol leva a alterações na rigidez e permeabilidade das membranas, assim como influencia a atividade de diversas proteínas ligadas à membrana, como quitina-sintetases (Schmidt *et al.*, 1999). Adicionalmente, há evidências de que o ergosterol sirva como um agente de extinção de oxigênio *singlet*, assim como absorva as reações de peroxidação de lipídios, gerada por radicais de oxigênio, atuando na proteção celular contra o estresse oxidativo (Schmidt *et al.*, 1999; Bocking *et al.*, 2000). Uma alteração no padrão normal de esteróis levaria a uma diminuição da proteção a agentes geradores de estresse oxidativo presentes no metabolismo respiratório de fontes não fermentáveis de carbono (Schmidt *et al.*, 1999). O mutante *pso6-1* é deficiente na quantidade de esteróis na membrana celular, principalmente em ergosterol. Esta seria a explicação para a sensibilidade apresentada por este mutante frente a agentes geradores de estresse oxidativo como paraquat, peróxido de hidrogênio 3-CPs + UVA (Querol *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1999).

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

Este mutante é também sensível ao agente químico UV mimético 4-NQO, mas mostrou resistência semelhante à selvagem ao agente 8-MOP+UVA, bem como ao tratamento com UV e HN2 (Pungartnik *et al.*, 1999).

O mutante *ps08-1* foi fenotipicamente caracterizado pela sua sensibilidade a 3-CPs e 8-MOP fotoativados, bem como a UVC, MNNG, 4-NQO e a DEO. Também apresentou redução na mutagênese induzida e um fenótipo mutador espontâneo (Rolla *et al.*, 2001). Ensaio de interação gênica alocaram o gene *PSO8* no grupo epistático *RAD6*, e sua recente clonagem revelou o alelismo entre *PSO8* e *RAD6* (Rolla *et al.*, 2002). O produto do gene *RAD6* é uma enzima ubiquitina-conjugante (Prakash 1974; Jentsch *et al.*, 1987; Sung *et al.*, 1988; Hass *et al.*, 1990) envolvida em reparação de DNA, esporulação, recombinação mitótica e meiótica, indução de mutagênese espontânea e induzida e na via de degradação de proteínas (regra da extremidade N-terminal) (Morrison *et al.*, 1988; Dohmen *et al.*, 1991; Prakash *et al.*, 1993; Lawrence, 1994; Friedberg *et al.*, 1995), genes silenciosos (Bryk *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 1998) e transposição Ty1 (Picologlou *et al.*, 1990; Liebman e Newnam, 1993; Huang *et al.*, 1999).

O mutante *ps09-1* é o *ps0* mais recente identificado. Caracterizado por sua sensibilidade a 3-CPs e 8-MOP fotoativados e por complementar a sensibilidade de todos os mutantes *ps0*, descritos até então, esta mutação foi considerada um novo alelo implicado na reparação do DNA. Recentemente a clonagem por complementação aos fenótipos de sensibilidade a fotoadição de 8-MOP e radiação UVC revelou que a mutação *ps09-1* define um novo alelo do gene de checkpoint e resposta à danos no DNA MEC3 (Cardone *et al.*, 2002). Este mutante também é sensível a diversos agentes mutagênicos, incluindo 3-CPs+UVA e MNNG (Machado, 2000). A mutação *ps09-1* confere ainda redução na mutagênese induzida, quando tratado com psoralenos fotoativados e UVC (Machado, 2000) mas não afeta a esporulação. Quando exposto a agentes oxidativos como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e paraquat, o mutante *ps09-1* mostra resistência semelhante à linhagem selvagem (Machado, 2000).

### 1.3.1 Os Genes *PSO2* e *PSO4*

Os mutantes *ps02-1* e *snm1-1* foram os primeiros isolados sensíveis especificamente aos tratamentos com 8-MOP +UVA (Henriques *et al.* 1980) e mostarda nitrogenada (HN2) (Ruhland *et al.*, 1981), respectivamente. 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, que pode, contudo, não ser importante para sua função em remover ICLs, desde que sua remoção mutacional manteve a resistência da célula semelhante à selvagem para sensibilidade a HN1 (Haase *et al.*, 1989). Mais recentemente foram identificados outros domínios conservados entre ortólogos do gene *PSO2* em vários outros organismos. Denominados de  $\beta$ -lactamase e  $\beta$ -CASP, análises *in silico* destas regiões entre diversas proteínas levou a 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 severa imunodeficiência no homem (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 pobremente transcrito (aproximadamente 0,3 transcritos/célula) (Richter *et al.*, 1992), mas pode ser induzido cerca de quatro vezes mais por mutágenos que produzam ICL, incluindo UVC, mas não por agentes alquilantes monofuncionais como MMS e por 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 *pso2-1* é proficiente no processo de incisão perto de sítios de DNA contendo ICL no locus transcricionalmente ativos *MAT $\alpha$* , mas não faz o mesmo no locus silencioso *HML $\alpha$* , sugerindo uma associação de *PSO2* com NER de genes transcricionalmente ativos (Meniel *et al.*, 1995). Mutantes *pso2/snm1* são capazes de incisar próximo às pontes intercadeias fotoinduzidas, mas não são capazes de reconstituir DNA de alto peso molecular, indicando então um bloqueio na etapa pós-excisão no mecanismo de reparação de ICL no DNA, independente de sua natureza química (Maganã-Schwencker *et al.*, 1982 Wilborn e Brendel, 1989). A sensibilidade de mutantes *pso2/snm1* é independente do tipo de base envolvida na formação de ICLs (Brendel e Henriques, 2001). 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 à mutantes deficientes na via de reparação recombinacional, os mutantes *ps02* 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 *ps02* 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 *ps02*, contrastando com mutantes de via de reparação NER e recombinacional (Magaña-Schuwenecke e Averbek, 1991). Isto sugere que Pso2p pode estar envolvida em alguma instância com modulação da cromatina. As investigações conduzidas com os mutantes *ps02* 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 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*.

O mutante *ps04-1*, chamado originalmente de *xs9*, é o único dos nove mutantes *ps0* que não é derivado da cultura de células de *S. cerevisiae* originalmente mutagenizada por Henriques *et al.*, (1980). Isolado através de sua moderada sensibilidade a raios X (Benathen e Beam, 1977), foi posteriormente renomeado para *ps04-1* devido a sua alta sensibilidade ao psoraleno fotoativado 8-MOP+UVA (Henriques *et al.*, 1989). Esta mutação confere um fenótipo pleitrópico em defeitos na reparação, incluindo sensibilidade a agentes formadores de ICLs, bloqueio na esporulação e mutagênese induzida (revisado em Henriques *et al.*, 1997) e é um mutante termocondicional, sem viabilidade a 36°C (Grey *et al.*, 1996). O mutante *ps04-1* é fenotipicamente semelhante ao mutante *recA* de *Escherichia coli*, combinando sensibilidade a radiações, mutágenos e bloqueio na recombinação e mutagênese induzida. A clonagem molecular mostrou que o gene *PSO4* é alelo ao gene *PRP19* (Grey *et al.*, 1996). Este gene essencial de levedura codifica uma proteína de 56,7 kDa (Cheng *et al.*, 1993) associada a um complexo proteico denominado *PRP19 associated complex* ou PRP19-AC contendo pelo menos outras sete proteínas já identificadas (detalhes em Revers *et al.*, 2002; Capítulo 2 deste trabalho) que é requerido para as primeiras etapas do processamento de mRNA. A disrupção deste gene é letal em células haplóides (Grey *et al.*, 1996) e diplóides heteroalélicas *ps04-1/ps04Δ*, embora

viáveis, demonstram retardo no crescimento (Grey *et al.*, 1996). Mutantes diplóides homozigóticos são defectivos em esporulação e mostraram uma redução acentuada em recombinação meiótica e mitótica (Meira *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 1995; Morais *et al.*, 1996). A análise de epistasia para sensibilidade a 8-MOP+UVA mostrou que o gene *PSO4* encontra-se também na via de reparação recombinacional RAD52 (Henriques *et al.*, 1997). As funções da proteína Prp19/Pso4 atuando no spliceossoma, o envolvimento na reparação de DNA sujeita a erros e suas atividades recombinacionais indicam que esta proteína pode estar associada com pelo menos dois complexos protéicos distintos na célula: um envolvendo o processamento de pré-mRNA e outro na reparação recombinacional (Capítulo 2). Assim, a sensibilidade a mutágenos, as baixas taxas de mutabilidade, recombinação e esporulação encontradas para o mutante *pso4-1* e suas diplóides homozigóticas, podem ser resultado de uma ausência ou falha no processamento de determinados pré-mRNAs relacionados a tais funções (Capítulo 2).

A recente caracterização do ortólogo humano hNMP200 do gene *PSO4/PRP19* de *S. cerevisiae* revelou um elevado grau de conservação desta nova proteína entre metazoários, plantas e parasitas (Gotzmann *et al.*, 2000). Com similaridade extensa (até 80% em algumas regiões) e como um componente abundante da matriz nuclear em células humanas foi sugerido por Gotzmann *et al.*, (2000) que esta proteína pode desempenhar duas funções: uma como proteína estrutural e outra como suporte para ligação do spliceossoma e modulação de sua atividade. As combinações do fenótipo pleiotrópico do mutante *pso4-1*, incluindo deficiência nos processos de recombinação, mutagênese e letalidade condicional, associado à recente caracterização do gene ortólogo humano hNMP200 e de progressos na caracterização das funções do complexo PRP19-AC (revisão em Revers *et al.*, 2002; Capítulo 2), torna este gene um candidato importante para compreensão das interconexões entre os mecanismos de reparação do DNA com outros processos diversos do metabolismo de leveduras, como processamento do mRNA e esporulação e, portanto, melhor compreender e definir as funções celulares de Pso4p/Prp19p.

#### **1.4. Análise funcional de interações proteína-proteína: a utilização do sistema dois-híbridos.**

Com o progresso nos estudos de proteínas envolvidas nas respostas celulares a danos no DNA, tornou-se necessário o emprego de técnicas que disponibilizassem dados sobre as bases da comunicação intracelular, transdução de sinais e dos mecanismos de regulação da expressão dos genes envolvidos nestas vias. As interações proteína-proteína e formação de macrocomplexos integralmente funcionais possuem papéis centrais em vários aspectos dessa organização estrutural e funcional, e sua análise tornou-se indispensável para uma abordagem de estudo completa desses processos biológicos (Tucker *et al.*, 2001).

A tecnologia do sistema duplo-híbrido de *S. cerevisiae* desenvolvida por Fields e Song (1994) (para revisão ver anexo 1) é uma das metodologias que tem sido usada com grande sucesso no estudo de complexos multiproteicos na reparação do DNA (Krejci *et al.*, 2001; Tsutsui *et al.*, 2001; Saffi *et al.*, 2001), processamento de pre-mRNA (Tsai *et al.*, 1999, Chen *et al.*, 2001, 2002; Ohi e Gould 2002) e também permitiu as primeiras análises em escala genômica de interações proteína-proteína em um organismo eucarioto (Ito *et al.*, 1999; Fromon-Racine *et al.*, 2000 Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001).

Classificando cerca de 2700 interações proteicas disponíveis na literatura de *S. cerevisiae* em 42 diferentes tipos de categorias funcionais, Schwikovisky *et al.*, (2000) gerou um mapa de interações funcionais dos dados encontrados. Esta análise global resultou em uma ampla rede contendo 2358 interações entre 1548 proteínas, onde proteínas de função conhecida e mesma localização celular tenderam a agrupar-se. Esta abordagem também permitiu indicar a possível função de outras proteínas de acordo com funções conhecidas de seus interatores.

## 1.5. Objetivos

A maioria dos processos celulares nucleares envolvendo a manutenção da integridade/estabilidade genômica é desempenhado por complexos multiproteicos que interagem entre si e atuam de forma coordenada/regulada para garantir a fidelidade do fluxo da informação genética. A caracterização molecular dos genes *PSO* têm contribuído para o esclarecimento dos vários mecanismos que envolvem etapas multienzimáticas de reparação celular de lesões no DNA, assim como os mecanismos implicados na reparação de lesões induzidas por psoralenos fotoativados. Para melhor compreender e situar funcionalmente o papel das proteínas codificadas pelos genes de reparação do DNA *PSO2* e *PSO4*, a investigação deste trabalho foi direcionada com o objetivo principal de estender a caracterização genética e molecular destes genes em *Saccharomyces cerevisiae*:

### 1.5.1. Objetivos específicos:

- Avaliar se o fenótipo pleiotrópico observado na linhagem mutante *psO4-1* pode ser explicado exclusivamente por processamento de pré-mRNA defeituoso;
- Determinar se a proteína Pso4p/Prp19p é capaz de interagir com outras proteínas não envolvidas com de processamento de pré-mRNA;
- Isolar e identificar genes codificantes de proteínas capazes de interagir com Pso2p pelo sistema dois-híbridos;
- Identificar domínios proteicos importantes para a função e manutenção das interações proteicas observadas para Pso2p e Pso4p;
- Avaliar a interação genética em combinações de linhagens mutantes simples e duplos com os interatores potenciais isolados de Pso2p e Pso4p, respectivamente, após tratamento com agentes mutagênicos.

## **CAPÍTULO II**

**“Thermoconditional modulation of the pleiotropic  
sensitivity phenotype by the *Saccharomyces cerevisiae*  
*PRP19* mutant allele *pso4-1*”**

# Thermoconditional modulation of the pleiotropic sensitivity phenotype by the *Saccharomyces cerevisiae* *PRP19* mutant allele *pso4-1*

L. F. Revers, J. M. Cardone, D. Bonatto, J. Saffi, M. Grey<sup>1</sup>, H. Feldmann<sup>2</sup>, M. Brendel<sup>1</sup> and J. A. P. Henriques\*

Depto. de Biofísica/Centro de Biotecnologia–IB-UFRGS, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43421, Campus do Vale, 91501-907 Porto Alegre, RS, Brazil, <sup>1</sup>Institut für Mikrobiologie, Abteilung Biologie f. Mediziner, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Theodor-Stern-Kai 7, Haus 75, 60590 Frankfurt/Main, Germany and <sup>2</sup>Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians Universität, München, Feodor-Lynen-Strasse 25, 81377 München, Germany

Received April 29, 2002; Revised and Accepted September 30, 2002

DDBJ/EMBL/GenBank accession no. AF500479

## ABSTRACT

**The conditionally-lethal *pso4-1* mutant allele of the spliceosomal-associated *PRP19* gene allowed us to study this gene's influence on pre-mRNA processing, DNA repair and sporulation. Phenotypes related to intron-containing genes were correlated to temperature. Splicing reporter systems and RT-PCR showed splicing efficiency in *pso4-1* to be inversely correlated to growth temperature. A single amino acid substitution, replacing leucine with serine, was identified within the N-terminal region of the *pso4-1* allele and was shown to affect the interacting properties of Pso4-1p. Amongst 24 interacting clones isolated in a two-hybrid screening, seven could be identified as parts of the *RAD2*, *RLF2* and *DBR1* genes. *RAD2* encodes an endonuclease indispensable for nucleotide excision repair (NER), *RLF2* encodes the major subunit of the chromatin assembly factor I, whose deletion results in sensitivity to UVC radiation, while *DBR1* encodes the lariat RNA splicing debranching enzyme, which degrades intron lariat structures during splicing. Characterization of mutagen-sensitive phenotypes of *rad2Δ*, *rif2Δ* and *pso4-1* single and double mutant strains showed enhanced sensitivity for the *rad2Δ pso4-1* and *rif2Δ pso4-1* double mutants, suggesting a functional interference of these proteins in DNA repair processes in *Saccharomyces cerevisiae*.**

## INTRODUCTION

The radiation-sensitive *pso4-1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*, originally isolated as *xs9* (1), shows a pleiotropic phenotype, including sensitivity to DNA cross-linking agents, nearly blocked sporulation, reduced mutability, and is a

thermoconditional mutant with no viability at 36°C (2,3). Thus, *pso4-1* is phenotypically similar to the *recA* mutant of *Escherichia coli*, as it combines mutagen and radiation sensitivity with a block in recombination and in induced mutagenesis (2,3). Heterologous expression with a multi-copy vector containing the *E.coli recA* gene restored the induced mutagenesis in the *pso4-1* genetic background (4). The combination of the deficiency phenotypes in recombination and error-prone repair made *PSO4* a very interesting candidate for further understanding of the interconnection between these DNA repair processes.

Cloning of the *PSO4* gene by complementation of the *pso4-1* mutant's lack of UV-induced mutability and inability to sporulate revealed its allelism to the known yeast gene *PRP19* (5). *PRP19* encodes an essential splicing factor associated with a protein complex that is required for the first cleavage–ligation step in the splicing reaction (6–9). Up to now, excluding Prp19p, seven components of the Prp19p-associated complex [Ppr19-AC] are known: Cef1p (also known as Ntc85p), Ntc90p (also known as Syf1p) and Ntc77p (also known as Clf1p or Syf3p) are all encoded by essential genes and were identified by direct sequencing of purified components of the complex (10,11). The other four components, Snt309p (also named Ntc25p), Ntc20p, Ntc30p (also named Isy1p) and Ntc31p are all encoded by non-essential genes without any functional motifs in their protein sequences (10–14). Together, they form the Prp19-AC that associates with the spliceosome as a functional integral complex (11). Not bound tightly to small nuclear RNAs, Prp19p is, by definition, not an intrinsic component of the spliceosome, suggesting that its transient association (with the spliceosome) possibly mediates conformational rearrangements or stabilizes the structure of the spliceosome during U4-snRNA dissociation (11,14).

The recent characterization of the yeast *PSO4/PRP19* human ortholog hNMP200 gene revealed a high evolutionary conservation of this new protein among metazoans, plants and parasites (15). Its extensive homology (up to 80%) and its abundance as a component of the nuclear matrix suggest that

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +55 51 3316 6069; Fax: +55 51 3316 6084; Email: pegas@dna.cbiot.ufrgs.br

**Table 1.** List of *S.cerevisiae* strains used in this study

Strain	Relevant genotype	Source
MB1620 5A	Mata <i>ura3-52 ade2 adeX LYS2 his3 trp1 leu2 pso4-1</i>	This work
MB1620 5D	Mata <i>ura3-52 ADE lys2 HIS3 TRP1 LEU2 PSO4</i>	This work
W303	Mata/Mata <i>ura3-1/ura3-1 ade2-1/ade2-1 trp1-1/trp1-1 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 can1-100/can1-100 PSO4/PSO4</i>	(41)
MG5128	Mata/Mata <i>ura3-52/ura3 ade2/ADE can1/CAN pso4-1/ps04-1</i>	(5)
MG5101	Mata/Mata <i>ura3-1/ura3-1 ade2-1/ADE trp1-1/TRP leu2-3,112/LEU his3-11,15/HIS can1-100/CAN pso4::HIS3/ps04-1</i>	(5)
LF1 1A	<i>ade2 adeX ura3-52 leu2 trp1 his3 lys2 cup1::ura3 pso4-1</i>	This work
LF1 2A	<i>ade2 adeX ura3-52 leu2 trp1 his3 lys2 cup1::ura3 PSO4</i>	This work
LF2 9A	Mata <i>ade2 adeX ura3 leu2 his3 met15Δ0 TRP1 rad14::kanMX4 PSO4</i>	This work
LF2 9B	Mata <i>ade2 adeX ura3 leu2 his3 met15Δ0 trp1 rad14::kanMX4 pso4-1</i>	This work
LF2 9C	Mata <i>ADE2 ura3 leu2 his3 MET15 trp1 RAD14 pso4-1</i>	This work
LF2 9D	Mata <i>ADE2 ura3 leu2 his3 MET15 TRP1 RAD14 PSO4</i>	This work
LF3 1A	Mata <i>ADE2 ura3 leu2 his3 MET15 trp1 rlf2::kanMX4 PSO4</i>	This work
LF3 1B	Mata <i>ADE2 ura3 leu2 his3 met15Δ0 TRP1 RLF2 pso4-1</i>	This work
LF3 1C	Mata <i>ade2 adeX ura3 leu2 his3 MET15 TRP1 RLF2 PSO4</i>	This work
LF3 1D	Mata <i>ade2 adeX ura3 leu2 his3 met15Δ0 trp1 rlf2::kanMX4 pso4-1</i>	This work
LF4 1A	Mata <i>ADE2 ura3-52 his3 leu2 rad2::TRP1 pso4-1</i>	This work
LF4 1B	Mata <i>ade2 adeX ura3-52 his3 leu2 trp1 RAD2 pso4-1</i>	This work
LF4 1C	Mata <i>ADE2 ura3-52 his3 LEU rad2::TRP1 PSO4</i>	This work
LF4 1D	Mata <i>ade2 adeX ura3-52 his3 LEU trp1RAD2 PSO4</i>	This work
Y00787	Mata <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rad14::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y05437	Mata <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rlf2::kanMX4</i>	EUROSCARF
SX46A RAD2°	Mata <i>ade2 his3-532 trp1-289 ura3-52 rad2::TRP1</i>	E. C. Friedberg <sup>a</sup>
L5	Mata <i>cup1::ura3 leu2 trp1 ura3-52 lys2 his3 ade</i>	(20)
EGY48	Mata <i>ura3 his3 trp1 LexAOp(6)::LEU2</i>	R. Brent <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Molecular Pathology, Department of Pathology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA.

<sup>b</sup>Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA.

hNMP200 may have two functions: one as a structural protein of the nuclear scaffold and a second as a support for spliceosome binding and activity (15). However, databases lack metazoan or plant cell counterparts of other known members of the Prp19-AC and thus the existence of a similar complex in higher eukaryotes is not proven (11). The conditionally-lethal *pso4-1* mutant allele of *PRP19* (5), the presence of the human ortholog hNMP200 (15) and the recent progress made in characterization of the Prp19-AC (9–14) allow us to study this gene's pleiotropic influence on metabolic processes in yeast (as diverse as pre-mRNA processing, DNA repair and sporulation) and hence, to better define the cellular functions of the *PSO4/PRP19*-encoded protein.

In this study, we addressed two questions: first, can the pleiotropic phenotype of the *pso4-1* mutant be explained solely by impairment of the PRP19-AC? And second, does Prp19p/Pso4p, as suggested by the role of its human ortholog, interact with proteins other than the spliceosomal factors? The influence of the Prp19p/Pso4p on splicing could be measured by exploiting the temperature influence in the conditionally-lethal *pso4-1* mutant. Possible binding partners different from the spliceosomal factors were collected via a two-hybrid screening (16) using the full-length *LexA-PSO4/PRP19* DNA-binding domain fusion gene as bait and a genomic *S.cerevisiae* library. Amongst the potential interactors, we isolated a collection of different fusion proteins that could be grouped into four functional classes: cell cycle, chromatin structure and chromosome dynamics, DNA repair, and mRNA splicing.

## MATERIALS AND METHODS

### Yeast strains

The yeast strains used in this study are listed in Table 1. The *pso4-1* strain MB1620-5A was mated with the strain L5 (*cup1Δ::ura3*) (17), Y00787 (*rad14::kanMX4*) (EUROSCARF, Frankfurt), Y05437 (*rlf2::kanMX4*) (EUROSCARF, Frankfurt) and SX46ARAD2° (*rad2::TRP1*) (courtesy of E. C. Friedberg, University of Texas, Dallas). Phenotypes of the haploid ascospores were determined by establishing the respective deletion markers: geneticin resistance (*rad14::kanMX4*; *rlf2::kanMX4*), sensitivity to temperature (37°C-*pso4-1*), tryptophan prototrophy (*rad2::TRP1*) and sensitivity to copper (*cup1Δ::ura3*) as described previously (18).

### Genetic and molecular biological methods

Techniques in yeast genetics were according to Rose *et al.* (19) and standard molecular techniques were performed according to Sambrook *et al.* (20) and Ausubel *et al.* (21).

### *Escherichia coli* strains and plasmids

*Escherichia coli* strains XL1-blue (Stratagene), KC8 (22) and TOP10 (Invitrogen) were used as recipients for cloning procedures. The following vectors were used: pLexAPRP19 (contains the *PSO4/PRP19*-coding ORF fused to the LexA DNA-binding domain of pEG202); ActSNT309 (contains the SNT309-coding ORF fused to the *GAL4*-activation domain of pACT2) and ActPRP19 (contains the *PSO4/PRP19*-coding ORF fused to the *GAL4*-activation domain of pACT2) were a gift from Soo-Chen Cheng (Institute of Molecular Biology,



Academia Sinica, Nankang, Taiwan). pSB18 (*TRP1*, *CEN/ARS*, *Amp<sup>R</sup>*), a single copy plasmid containing the *ACT1-lacZ* splicing reporter construct, was kindly provided by C. Columbano (Instituto de Química, Universidade de São Paulo, SP, Brasil). pJU83 (*LEU2*,  $2\mu$ , *Amp<sup>R</sup>*), a multicopy plasmid containing the *ACT1-CUP1* splicing reporter construct, was kindly provided by C. Guthrie (Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco). Single copy plasmid pMG470 (5), containing a functional *PRP19* gene, was employed to complement *pso4-1* in mutability studies.

### Media and growth conditions

Yeast strains were grown in YEPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) at 23, 25, 28, 30 or 33°C, according to the needs of the experiments. For selective growth, either YEPD plus geneticin (G418, Calbiochem, 0.2 mg/ml) or SynCo (SC) (0.67% yeast nitrogen base from DIFCO/USB, 2% glucose, 1% ammonium sulfate) supplemented with the appropriate essential nutrients (40 µg/ml) was used. For detection of canavanine-resistant mutants, canavanine sulfate (Sigma) was added at 40 µg/ml to appropriately supplemented SynCo media. The sporulation medium (KAC) contained 1% potassium acetate, 0.1% yeast extract and 0.05% glucose. Diploids were sporulated on KAC agar for 3–5 days. Sporulation efficiency was calculated by determining asci in a counting chamber. The medium for plates was solidified with 2% agar.

### Treatments with NaCl, calcofluor white, benomyl and caffeine

Stationary cultures were serially diluted in 1:10 steps and 5–10 µl aliquots were then spotted onto YEPD medium containing NaCl (900 mM), benomyl (40 µg/ml), caffeine (0.5 µg/ml) and calcofluor white (30 µg/ml), prepared as described previously (23–25).

### Mutagen treatments and forward mutation analysis

**UVC.** Different concentrations of cells in the exponential phase of growth ( $\sim 10^7$  cells/ml) were spread in triplicate on YEPD plates and, after drying, irradiated with UVC (Stratalinker, Stratagene) with doses ranging from 0 to 60 J/m<sup>2</sup>. For drop tests, stationary cultures were serially diluted in 1:10 steps and 5–10 µl aliquots were then spotted onto YEPD medium. After drying, the plates were UVC-irradiated as described above.

**8-MOP + UVA.** Suspensions of  $5 \times 10^6$  cells/ml in exponential phase were treated with photoactivated 8-methoxy-psoralen (Sigma), 8-MOP + UVA according to Henriques and Moustacchi (26). After all treatments, the plates were incubated for 3–5 days at the appropriate temperature in the dark. Survival data represent the average of at least three experiments.

**Forward mutation analysis.** Drops (20 µl) of cell suspension ( $2 \times 10^8$ /ml) were spotted on SynCo + Can media and, after drying, UVC-irradiated at doses ranging from 0 to 60 J/m<sup>2</sup>. Incubation was for 5 days at temperatures of 23, 28 and 33°C. Survival was determined by plating appropriate dilutions on

SynCo media. UVC irradiation and growth procedures were as described above.

### Two-hybrid analysis

Two-hybrid analysis was carried out essentially as described by Gyuris *et al.* (22). Yeast strain EGY48, containing the reporter plasmid pSH18-34 and the bait plasmid pLexA-*PSO4*, was transformed with a yeast genomic library cloned into the prey plasmid pJG4-5 (27). Plasmids were isolated from yeast that survived selection for leucine prototrophy on galactose and showed *lacZ* expression on X-Gal-galactose plates. *Escherichia coli* strain K12 KC8 *pyrF::Tn5*, *hsdR*, *leuB600*, *trpC9830*, *lacD74*, *strA*, *galk*, *hisB436* was used for the rescue of the plasmids as described by Gyuris *et al.* (22). Plasmid DNA was sequenced with an Applied Biosystems (Foster City, CA) sequencer. All sequences obtained were submitted to a BLAST search at MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences) (28).

### Construction of pLexAPso4-1

PCRs of genomic DNA using specific primers [PSO4N (5'-GCCAAGAAAGCCAACTAGGG-3') and PSO4C (5'-GAAAGTACAAACGTGTCAGCG-3')] and a high-fidelity thermostable DNA polymerase (Pwo<sup>®</sup>, Roche Molecular Biochemicals) were used to amplify the sequence of the *pso4-1* mutant allele. Standard molecular techniques were used to replace a 645 bp internal fragment (*Ban*II to *Bst*EII) within the *PRP19* coding region of pLexAPRP19 with the fragment containing the L45S mutation, yielding pLexAPso4-1. The expression of the LexA fusion baits was analyzed by western blotting using a monoclonal antibody against LexA (Clontech Laboratories Inc.).

### Sequencing of the *pso4-1* mutant allele

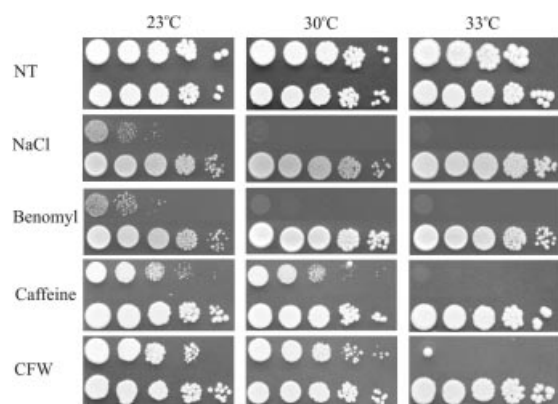
PCRs of genomic DNA, using specific primers and a high-fidelity thermostable DNA polymerase (Pwo<sup>®</sup> from Roche Molecular Biochemicals), were performed to amplify the sequence of the mutant allele. The PCR product was cloned in the pZero-2 vector (Invitrogen) and five individual clones were completely sequenced on both strands in an automated sequencer (Abi Prism A-377).

### RT-PCR analysis

Total RNA was purified from exponential phase cultures using the QIAGEN RNeasy kit. Equal amounts of total RNA (1 µg) were subjected to cDNA synthesis using the specific antisense primer for the *S.cerevisiae ECM33* gene (5'-TTATCTACATATAAAATTCAGTGATGAACC-3') and SUPERSCRIPT II reverse transcriptase from Gibco-BRL. PCR was carried out with 10% of the first strand cDNA synthesis reaction [with the sense primer (5'-ATGCAATTCAA-GAACGCTTTGACTG-3') and antisense primer (5'-TTATCTACATATAAAATTCAGTGATGAACC-3'), with the sense primer beginning at the ATG start codon] which was carried out according to the manufacturer's protocol.

### β-Galactosidase assay

Exponential phase cultures ( $\sim 2 \times 10^7$  cells/ml) were used to assay the activity of the *ACT1-lacZ* splicing reporter (pSB18) and from the pSH18-34 two-hybrid reporter plasmid. β-Galactosidase activity was assayed and quantified according



**Figure 1.** Temperature-dependent splicing-related phenotypes tested at 23, 30 and 33°C. Upper lines show *pso4-1* mutant strain. Lower lines show wild-type strain. NT, no treatment; NaCl (900 mM); benomyl (40  $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ ); caffeine (0.5 mg  $\times \text{ml}^{-1}$ ) and CFW, calcofluor white (30  $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ ).

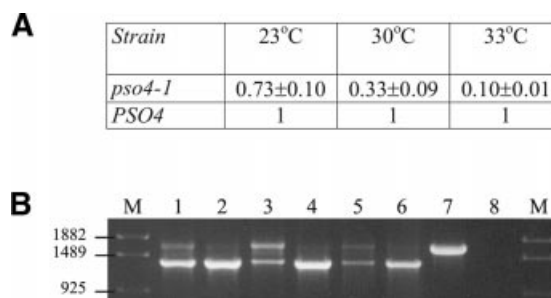
to Ausubel *et al.* (21). Three to four individual transformants were assayed in liquid SC lacking the appropriate nutrients. When using the *ACT1-CUP1* fusion construct, stationary cultures were serially diluted by 1:10 steps and 5–10  $\mu\text{l}$  aliquots were spotted on SynCo media plates containing 10 mM  $\text{CuSO}_4$ , prepared as described by Lesser and Guthrie (18). In *ACT1-lacZ* and *ACT1-CUP1* splicing reporters the *lacZ* and *CUP1* coding ORFs are fused in frame with the initial part of the second exon of the *ACT1* coding ORF, thus allowing  $\beta$ -galactosidase activity or  $\text{CuSO}_4$  resistance if the pre-mRNA transcript is correctly processed.

## RESULTS

### Temperature-dependent splicing-related phenotypes

The allelism of *PSO4* and *PRP19* (5) suggested that an altered Pso4-1p would influence more than one cellular function, since non-effective pre-mRNA splicing could influence the expression of up to 238 intron-containing genes of *S.cerevisiae* (28). Therefore, we tested the temperature-dependent expression of some selected phenotypes correlated to intron-containing genes in the *pso4-1* mutant. Figure 1 shows that indeed all phenotypes were influenced by changes of temperature and that there is significantly higher resistance to caffeine and to calcofluor white at the permissive temperature of 23°C. At 33°C the *pso4-1* mutant is highly sensitive to all treatments.

To test if the phenotypes were most likely a consequence of impaired pre-mRNA processing, the splicing reporter system *ACT1-lacZ* (pSB18 plasmid) and standard RT-PCR were used to assay for splicing efficiency at the same temperatures. Figure 2A shows a good correlation between the temperature-dependent sensitivity phenotypes and *ACT1-lacZ* activity, where the *pso4-1* mutant still has nearly 70% of pre-mRNA processing efficiency at 23°C but only ~10% at 33°C. Additionally, another splicing reporter system, the *ACT1-CUP1* fusion construct, was used to confirm splicing efficiency in the same conditions. Expressed from the multi-copy plasmid pJU83, *ACT1-CUP1* allowed regular growth of the *pso4-1* mutant in the presence of 10 mM  $\text{CuSO}_4$  at 23 and 30°C but not at 33°C, indicating low processing efficiency of



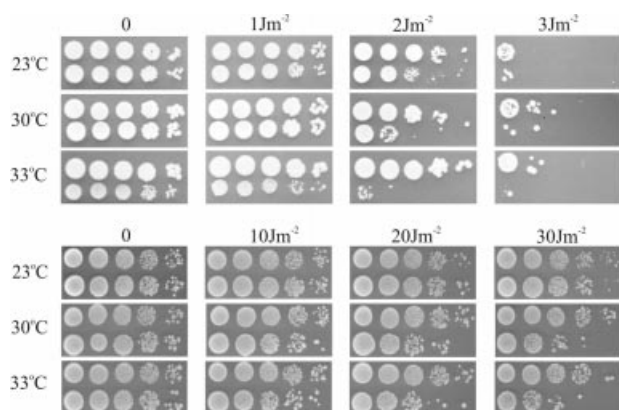
**Figure 2.** Evaluation of splicing efficiency at different temperatures. (A) Relative levels of *ACT1-lacZ* fusion splicing reporter system for the *pso4-1* mutant strain at 23, 30 and 33°C. (B) *ECM33*-specific RT-PCR reactions of the *pso4-1* mutant strain at 23°C (lane 1), 30°C (lane 3) and 33°C (lane 5). Lanes 2, 4 and 6 stand for the WT strain at the same temperatures, respectively. M is the molecular marker in base pairs. Lane 7 shows the positive control where total DNA was used to amplify the *ECM33* gene. Lane 8 shows the control without reverse transcriptase.

the *ACT1-CUP1* fusion reporter at the higher temperature (data not shown). Although untreated *pso4-1* has a predicted splicing efficiency of only 10% at 33°C it survives reasonably well on YEFD at this temperature. Increasing the growth temperature to 34–35°C led to a lethal phenotype (data not shown).

The temperature-sensitive *prp19* mutant accumulates unspliced precursor mRNA at non-permissive temperatures as described previously (6). We could complement our results obtained with the *ACT1-lacZ* splicing reporter system by determining splicing efficiency of the transcript of the intron-containing *ECM33* gene in *pso4-1* using RT-PCR. *ECM33* was chosen due to its nearly constitutive expression during the cell cycle, the hypersensitivity of a *ecm33* mutant strain to calcofluor white (25) and the reasonable size of its sole intron (329 bp), which allows easy distinction between processed and non-processed gene products. The differential efficiency of pre-mRNA processing relative to growth temperature is shown in Figure 2B. Confirming our data obtained with the *ACT1-lacZ* reporter, the amount of processed mRNA is significantly lower at 33°C as compared with *ECM33* mRNA obtained from cells grown at 23°C. This supports the hypothesis of a thermoconditional splicing-related pleiotropic sensitivity phenotype for *pso4-1*. Similar influence by temperature variation changes was observed for the UVC-sensitivity phenotype of *pso4-1* (described in detail below).

### Is *pso4-1*-mediated UV sensitivity due to non-processed pre-mRNA of DNA repair genes?

*RAD14* is the only intron-containing DNA repair gene indispensable for the recognition/incision step of the nucleotide excision repair (NER) pathway in yeast (29). To exclude the possibility that most of the DNA repair-associated phenotypes of the *pso4-1* mutant could result solely from faulty processing of *RAD14*-transcribed pre-mRNA, we tested *rad14/pso4-1* double mutants for survival after UV irradiation at permissive and restrictive temperatures. Placing a *rad14* mutant allele into a *pso4-1* background yielded double mutants already with higher UVC sensitivity at 23°C than *rad14* alone (synergistic interaction; Fig. 3, upper panel). The *pso4-1* single mutant strain showed a temperature-



**Figure 3.** Thermoconditional UVC-sensitivity of single (*pso4-1* or *rad14Δ*) and double mutant (*pso4-1/rad14Δ*) strains at given doses ( $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ ) and temperatures. Upper panel shows survival of *rad14Δ* (upper lines) and the double mutant strain *pso4-1/rad14Δ* (lower lines). Lower panel shows survival of *pso4-1* strain (lower lines) and wild-type strain (upper lines).

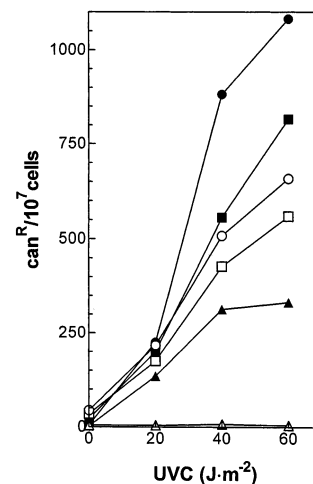
**Table 2.** Sporulation efficiency (%) of diploid strains containing different *pso4-1* alleles (*pso4-1/pso4-1*, *pso4-1/pso4::HIS3* and *PSO4/PSO4*), at 23, 30 and 33°C

Strains	23°C	30°C	33°C
W303 WT( <i>PSO4/PSO4</i> )	43.8 ± 2.3	50.0 ± 3.0	29.8 ± 4.7
MG5128( <i>pso4-1/pso4-1</i> )	13.2 ± 0.9	0.5 ± 0.7	0
MG5101( <i>pso4-1/pso4::HIS3</i> )	1.1 ± 0.3	0.1 ± 0.2	0

dependent UV sensitivity phenotype with nearly wild-type resistance at 23°C and increased sensitivity at 30 and 33°C, respectively (Fig. 3, lower panel). This suggests a further indirect contribution of Pso4p/Prp19p in the repair of UVC damage, independent of *RAD14* pre-mRNA processing. An overlapping effect of additional intron-containing genes involved in DNA repair (e.g. *MMS2*, *RFA2* and *KIN28*), due to reduced splicing, cannot be excluded (see Discussion).

### Thermoconditional survival, mutability and sporulation in *pso4-1* mutants

The association of defects in DNA repair with impaired recombination, induced mutagenesis and sporulation (3) in *pso4-1* mutant strains prompted us to investigate further the influence of temperature on induced mutagenesis and sporulation efficiency. Table 2 summarizes the influence of temperature on sporulation efficiency of homoallelic (*pso4-1/pso4-1*) and heteroallelic (*pso4-1/pso4::HIS3*) diploid strains compared with the corresponding wild-type. Efficiency of sporulation decreases with increasing growth temperature, and no asci are detectable at 33°C in the mutant strains. A significant further decrease in sporulation efficiency can be observed in the heteroallelic *pso4* mutant where the presence of only one *pso4-1* mutant allele leads to a dramatic decrease of sporulation already at 23°C. When examining the temperature influence on induced mutagenesis in the canavanine forward mutagenesis assay, a similar response is found in the haploid *pso4-1* mutant. Transformation of *pso4-1* with a single copy plasmid containing the intact *PRP19* gene can restore



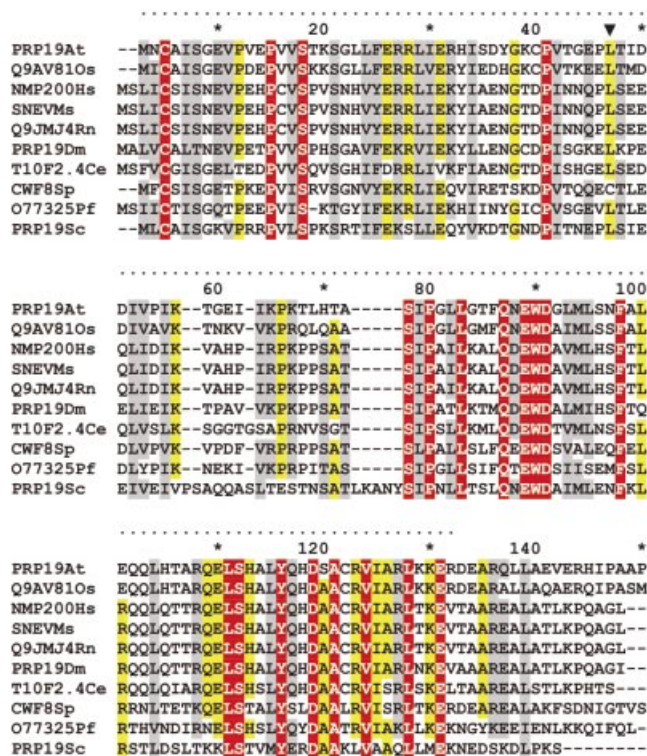
**Figure 4.** Thermoconditional mutability in *pso4-1* mutant strains transformed with the single-copy pMG470 (5), containing a functional *PRP19* gene. Open symbols show *pso4-1* mutant strains harboring the empty plasmid tested at 23°C (circles), 28°C (squares) and 33°C (triangles). Closed symbols show *pso4-1* mutant strains harboring single copy pMG470, tested at 23°C (circles), 28°C (squares) and 33°C (triangles).

forward mutability and viability of the cells at 33°C to a significant extent (Fig. 4).

### A single amino acid change in Pso4-1p leads to the thermoconditional phenotype and affects Pso4-1p self-interaction

With the aim to investigate why the *pso4-1* mutation confers a pleiotropic phenotype, the complete sequence of the mutant allele was determined. The comparison of obtained sequences from five different clones with the databank-deposited wild-type sequence revealed a single amino acid substitution in triplet 45 (T→C transition, changing TTA to TCA), replacing leucine with serine [L45S] and thus changing this amino acid position from apolar to polar. The Pso4-[L45S] mutation affects a highly conserved amino acid residue located within the 130 amino acids encompassing the N-terminal region similar in all *PSO4/PRP19* homologs. This region has a minimal similarity of 50% amongst potential orthologs of *PSO4/PRP19* in various organisms (Fig. 5), a fact that suggests a high functional relevance of this protein domain.

Prp19p interacts with itself and is thought to exist in an oligomeric form in the PRP19-AC (9). Although not required for yeast growth, Snt309p interacts directly with Prp19p, playing an important role in modulating interactions of Prp19p with other associated components in stabilizing Prp19-AC (12,13). Therefore, the two hybrid assay (THA) was employed to evaluate the effect of the L45S mutation on the interaction of Pso4p with itself and with Snt309p. The *LexAPso4-1* mutant bait was co-expressed with the activation domain fusion plasmids pACT2PRP19 and pACT2SNT309, expressing the Pso4p wild-type and Snt309p activation domain fusion proteins, respectively. Table 3 shows that Pso4-[L45S] considerably reduces the interaction of this altered Prp19p with itself but does not affect the interaction with the Prp19-AC-stabilizing protein Snt309p. This implies that the L45S mutation specifically affects the interaction of Pso4-1p with itself.



**Figure 5.** Amino acid alignment of Prp19p N-terminal domain and potential orthologs from various organisms. The dotted line denotes the first 130 amino acids, which display the highest degree of conservation. The L45S substitution position in Pso4-1p is indicated by an arrow. Identical residues are shown in red and conserved amino acids in yellow and gray. The accession numbers are PRP19At (*Arabidopsis thaliana* AAB80652), Q9AV810s (*Oryza sativa* AAK27816), NMP200Hs (*Homo sapiens* AJ131186), SNEVMm (*Mus musculus* AAK49039), Q0JM4Rn (*Rattus norvegicus* BAA95215), PRP19Dm (*Drosophila melanogaster* AAD46846), T10F2.4Ce (*Caenorhabditis elegans* Q10051), CWF8Sp (*S.pombe* O14011), O77325Pf (*Plasmodium falciparum* CAB11109) and PRP19Sc (*S.cerevisiae* P32523).

### Isolation of potential molecular partners of Pso4p/Prp19p using the two hybrid system

A two hybrid screen (THS) was used to identify proteins that may interact physically with Pso4p/Prp19p. The in-frame fusion of the entire *PSO4/PRP19* ORF to the LexA DNA binding domain (*pLexA-PSO4*) displayed no intrinsic transcriptional activation when transformed into strains containing reporter constructs regulated by LexA DNA-binding sites (data not shown). A population of  $1.1 \times 10^6$  independent transformants obtained after transformation with the prey library was pooled and aliquots were plated on selective medium containing galactose for induced expression of the activation domain fusion library. Some 224 clones were identified that allowed growth on SD-LEU as a result of the activation of the LexAop::LEU2 reporter construct. These clones were colony-purified, molecularly characterized by restriction mapping and re-tested for their ability to activate Gal-inducible transcription of two reporter constructs (*LexAop::LEU2* and *pSH18-34*; 22). Twenty-four transformants containing putative interactors, able to activate transcription of the two independent reporter constructs in the presence of *LexA-PSO4/PRP19*, were isolated. These same clones were unable

**Table 3.** Effect of the L45S mutation on the Prp19p/Pso4p self interaction and on interaction with Snt309p<sup>a</sup>

DNA binding domain plasmid (pEG202)	Activation domain plasmid (pACT2)	$\beta$ -Galactosidase activity <sup>b</sup>
PLexA PRP19	pACT2 PRP19	34.1 $\pm$ 4.9
PLexA PRP19	pACT2 SNT309	37.9 $\pm$ 6.2
PLexA pso4-1	pACT2 PRP19	12.4 $\pm$ 3.8
PLexA pso4-1	pACT2 SNT309	48.4 $\pm$ 16.8
PLexA SNT309 <sup>c</sup>	pACT2 SNT309	1.22 $\pm$ 0.24

<sup>a</sup>Plasmids that directed the synthesis of the DNA-binding domain (pEG202) and activation domain (pACT2) fusion proteins were introduced into EGY48. The strain also harbored pSH18-34, a very sensitive LexAop-*lacZ* reporter. All constructions expressed full length fusion proteins.

<sup>b</sup>Expressed in Miller Units. The values are averages from three to four independent transformants each assayed in duplicate.

<sup>c</sup>Combination of plasmids used as internal negative control, since an interaction is not expected (10,11,14).

to induce transcription when co-expressed with unrelated LexA DNA-binding domain fusions (*pRFHM1*; 22, *LexAPSO5*—yeast *RAD16* allele and *LexAHDF1*—yeast Ku70 protein), indicating that the interaction with *LexA-PSO4/PRP19* was specific. Further sequencing of the library plasmids revealed 13 different fusion protein products (Table 4). Five of these putative Pso4p/Prp19p interacting proteins are encoded by ORFs with as yet unknown function (with one being essential). The remaining eight interacting proteins can be roughly grouped into four functional classes: (i) DNA repair (one ORF), (ii) meiosis and cell cycle regulation (four ORFs, with one being essential), (iii) pre-mRNA splicing (one ORF) and (iv) chromatin structure and chromosome dynamics (two ORFs).

Out of the 13 different fusion proteins, we focused our efforts on the study of Pso4p/Prp19p interaction with the three most relevant candidates, corresponding to the genes *RAD2*, *RLF2* and *DBR1*. Encoding a protein homologous to the human xeroderma pigmentosum group G (XPG) and indispensable for the 3' recognition/incision step of the NER (30,31), Rad2p is a component of the nucleotide excision factor 3 (32). *RLF2* has been isolated as a gene required for normal distribution of the telomere-binding Rap1p protein within the nucleus (33) and is also involved in assembling of nucleosomes on newly replicated DNA, in DNA repair and telomere silencing (33–35). Deletion of *RLF2* increases the UVC sensitivity of yeast mutants (36) blocked in any of the three known DNA repair groups (NER, *RAD52*-mediated recombinational DNA repair and *RAD6*-mediated post-replicative DNA repair) (37). *DBR1* was identified and first cloned in yeast using a genetic screen aimed at identifying cellular factors involved in Ty1 retro-transposition (38). The *dbf1* mutation in *S.cerevisiae* reduces the Ty1 transposition frequency about 10-fold and leads to a severe defect in intron degradation, i.e. high levels of excised introns accumulate as lariat structures lacking their 3' tail (38). The C-terminal second half of the *RAD2* gene-coding region was independently isolated five times via THS whereas *RLF2* and *DBR1* were isolated only once. Table 5 shows the induced specific expression of *lacZ* reporter gene in the presence of the *LexAPSO4/PRP19* bait and Rad2, Dbr1 and Rlf2 prey proteins. The interaction study of Rad2, Rlf2 and Dbr1 prey

**Table 4.** Genes identified in a two-hybrid screen using pLEXAPRP19/PSO4 as bait

Gene	Gene information <sup>c</sup>	Extent of fusion <sup>d</sup>
<i>RAD2</i> (5) <sup>a</sup>	DNA repair; DNA endonuclease; repairosome	C-terminal second half of the protein
<i>SWM1</i> (4)	Nuclear; required for the last phase of sporulation	Contains the whole ORF
<i>YNL018c</i> (3) <sup>b</sup>	Unknown function	Starts at amino acid 10
<i>HSL1</i> (2)	Cell cycle control, C156 and C111	C-terminal two-thirds of the protein
<i>YLR132c</i> (2)	Unknown function, essential, induced during meiosis	Contains the whole ORF; starts at amino acid 2
<i>DBR1/PRP26</i> (1)	Lariat RNA splicing debranching enzyme	C-terminal third of the protein
<i>MDS3</i> (1)	Meiosis; regulator of early meiotic genes, C16, C46 and C106	C-terminal quarter of the protein
<i>NUD1</i> (1)	Cell cycle regulatory protein, essential, C106	C-terminal two-thirds of the protein
<i>PLO1</i> (1)	Unknown function, weak similarity to Nip80p, C152 (the same as <i>RAD16</i> and <i>RAD52</i> ) and C185	C-terminal half of the protein
<i>RLF2</i> (1)	Chromatin assembly complex, subunit p90	C-terminal two-thirds of the protein
<i>YAL028w</i> (1)	Interacts with <i>EST1</i> , a telomere elongation protein	C-terminal; starts at amino acid 494
<i>YDR124w</i> (1)	Unknown function	C-terminal third of the protein
<i>YML083c</i> (1)	Unknown function	C-terminal half of the protein

<sup>a</sup>Frequency of independent isolation is shown in parentheses.

<sup>b</sup>C indicates association of the respective isolate with the protein complex from the Yeast protein complex database (<http://yeast.cellzome.com/>).

<sup>c</sup>According to Mewes *et al.* (28) and Costanzo *et al.* (44), SGD (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>), and the Yeast protein complex database (<http://yeast.cellzome.com/>).

<sup>d</sup>Segment of each ORF fused to the transcriptional activation domain constructs.

proteins was further investigated by testing their ability to interact with the *LexAps04-1* mutant bait (harboring the L45S mutation). Comparing the induced  $\beta$ -galactosidase activity obtained with wild-type and mutated LexA fusion baits of Prp19p/Pso4p, we show that the L45S single amino acid substitution drastically reduces the level of interaction of Pso4-1p with itself and with these three potential interactors.

#### Genetic interaction between *PSO4*, *RAD2* and *RLF2* after induced DNA damage

The *ps04-1* mutant is sensitive to UVC and 8-MOP + UVA (2). In order to study the nature of the interactions found between *PSO4*, *RAD2* and *RLF2* with respect to DNA repair, survival was determined in single and double mutants after UVC and 8-MOP + UVA. The effect of temperature on pre-mRNA processing in *ps04-1* strains was minimized by incubating at 25°C. Survival data in Figure 6 show that the combination of the two mutant alleles always increased the sensitivity to UVC (synergistic interaction) or to 8-MOP + UVA (additivity). Although the encoded proteins are needed for different cellular functions, their interference suggests an indirect or direct physiological interaction between them (via Prp19-AC, see Discussion) as both are needed for a complete wild-type-like DNA repair.

## DISCUSSION

We aimed to test whether all repair-related phenotypes of the thermoconditional *ps04-1* mutant, i.e. mutagen sensitivity, low induced mutability and impaired sporulation, can be explained solely by splicing defects, or if the *PSO4/PRP19*-encoded protein may also play a direct role in DNA repair. Thus, we first established a high evidence of correlation between growth temperature and phenotypes related to intron-containing genes and to the respective processing of the encoded pre-mRNAs. By using splicing reporter systems and RT-PCR we could confirm that splicing efficiency in *ps04-1* was inversely correlated to growth temperature and that this mutant accumulates pre-mRNA at non-permissive temperatures, confirming results obtained with a conditional *prp19*

mutant (6,39). The differential influence of splicing efficiency on the phenotypes (Fig. 1) might be explained by the number of intron-containing genes contributing to its expression. Osmosensitivity can be associated with eight known intron-containing genes (28), three of which are essential [*ARP2/ACT2* (40), *GLC7* (41) and *ACT1* (42)], while benomyl resistance depends on four known intron-containing genes (28), one of them the essential *TUB1* (43). Calcofluor white sensitivity depends on three intron-containing genes, including the essential *SPT14* (28), while caffeine sensitivity associates with two non-essential intron-containing genes (28).

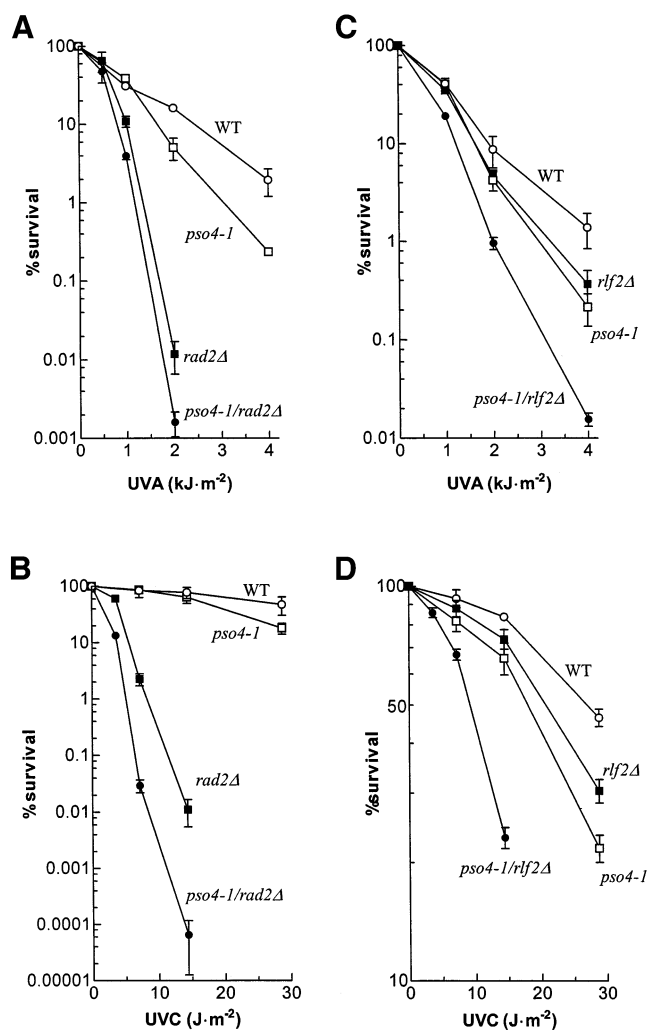
Of over 6200 genes of the *S.cerevisiae* genome, 238 are thought to contain introns (28). These genes encode proteins with functions in diverse physiological tasks and thus their lower or non-expression by sub-optimal splicing will result in a pleiotropic phenotype (28). The high number of genes, and the existence of ORFs of yet unknown function, complicate analysis of the repair phenotype of the *ps04-1* mutant. The intron-containing repair gene *RAD14* (29) could be responsible for most of the thermoconditional UVC sensitivity phenotype of *ps04-1* as reduced processing of its pre-mRNA at 33°C would lead to a failure of the DNA damage recognition/incision step of the very effective NER pathway (37). Comparison of single and double mutants of *rad14* $\Delta$  and *ps04-1* alleles for their UVC sensitivity suggested an indirect contribution of Pso4p independently of *RAD14* pre-mRNA processing. At least another three intron-containing genes, *MMS2*, *KIN28* and *RFA2*, function in DNA repair (28,44). Thus, an overlapping synergistic effect due to reduced splicing of their pre-mRNAs in *ps04-1* cannot be excluded. *MMS2* is a member of the error-free postreplication repair pathway and encodes an ubiquitin-conjugating enzyme, whose deletion renders mutants only slightly UVC-sensitive (45). Both *KIN28* and *RFA2* are essential genes and encode proteins associated with the NER pathway (46–48). Therefore, reduced splicing activity in a *ps04-1* mutant and hence impaired functionality of these and other unknown repair genes could negatively affect the NER and postreplication repair pathways, resulting in the observed pleiotropic mutagen sensitivity. However, at

**Table 5.** Effect of the L45S mutation on the interaction between Prp19p/Pso4p and its potential interacting proteins isolated in the THS<sup>a</sup>

DNA binding domain plasmid (pEG202)	Activation domain plasmid (pJG4-5)	Galactose	
		Leu	$\beta$ -Galactosidase activity <sup>b</sup>
PLexA GAL4	pJG4-5 (HA-tagged)	+++	1075 $\pm$ 210.4
PLexA Bicoid	pJG4-5 (HA-tagged)	-	0.3 $\pm$ 0.1
PLexA PRP19/PSO4	pJG4-5-RAD2 (amino acid 481-1031)	+++	140.0 $\pm$ 49.1
PLexA PRP19/PSO4	pJG4-5-RLF2 (amino acid 81-606)	+++	188.4 $\pm$ 64.2
PLexA PRP19/PSO4	pJG4-5-DBR1 (amino acid 239-405)	+++	54.0 $\pm$ 27.2
PLexA <i>pso4-1</i>	pJG4-5-RAD2 (amino acid 507-1031)	-	19.3 $\pm$ 5.6
PLexA <i>pso4-1</i>	pJG4-5-RLF2 (amino acid 81-606)	-	13.3 $\pm$ 7.5
PLexA <i>pso4-1</i>	pJG4-5-DBR1 (amino acid 239-405)	-	14.9 $\pm$ 1.9

<sup>a</sup>Plasmids that directed the synthesis of the DNA-binding domain (pEG202) and activation domain (pJG4-5) fusion proteins were introduced into EGY48. In addition to the LexAop(6)-*LEU2*, the strain also harbored pSH18-34, a very sensitive LexAop-*lacZ* reporter. All constructions expressed full length fusion proteins except when indicated. pLexA GAL4 is a transcription activator and was used as positive control; pLexA Bicoid contains residues 2-160 of the *Drosophila* bicoid gene product and was used as negative control.

<sup>b</sup>Expressed in Miller Units. The values are averages from three to four independent transformants each assayed in duplicate.



**Figure 6.** Survival of haploid wild-type, *pso4-1*, *rlf2Δ* and *rad2Δ* mutants after UVC and 8-MOP + UVA. (A) and (B) show survival of *pso4-1* in combination with *rad2Δ* for 8-MOP + UVA and UVC, respectively. (C) and (D) show survival of *pso4-1* in combination with *rlf2Δ* for 8-MOP + UVA and UVC, respectively.

23°C, the *pso4-1* single mutant strain shows a phenotype with nearly wild-type resistance when compared with the double mutant at the same temperature (Fig. 3, lower panel), suggesting that Prp19p/Pso4p may contribute to DNA repair apart from its function in pre-mRNA processing. Interestingly, over-expressed RecA protein of *E.coli* can complement most of the UVC sensitivity of the *pso4-1* mutant, a function that can be correlated with the recombination involvement of Rfa2p (4,49,50).

Since several intron-containing genes, e.g. *MEI4*, *CIN2* and *HOP2* and the *recA*-like *DMC1*, *REC107/MER2* and *REC114* are involved in specific steps in meiosis (51-59, respectively), sporulation should be a thermoconditional biological endpoint in *pso4-1*. Indeed, sporulation efficiency of homoallelic *pso4-1* and heteroallelic *pso4-1/pso4-1::HIS3* diploid strains was temperature-dependent (Table 2) and thus correlated to efficiency of pre-mRNA processing (Fig. 2). The residual splicing activity contributed by the single *pso4-1* mutant allele in the heteroallelic diploid led to a significantly lower sporulation already at permissive temperature, thus indicating co-dominance of *PSO4/PRP19* alleles in splicing activity in diploid yeast, as suggested previously for DNA repair (2,5).

UVC-induced mutagenesis in *pso4-1* in the canavanine resistance forward mutational test was strictly temperature-dependent, and no mutation induction could be observed at 33°C (Fig. 4). However, this temperature was also prohibitive for cell survival, so that non-viability and mutability are closely correlated on SynCo media, whereas YEPD still allowed for some survival at this condition (Figs 1, 3 and 6). Mutability could be restored in *pso4-1* by transforming with a single-copy *PRP19/PSO4*-containing plasmid (Fig. 4) so that reintroducing a functional Ppr19p/Pso4p suffices for nearly normal mutability in a *pso4-1* background. It should be noted that mutation induction is shown as mutants/treated cells; since the transformants had higher UVC sensitivity than wild-type, induced mutants/surviving cells would be considerably higher and similar to values obtained for *pso4-1* at 23°C.

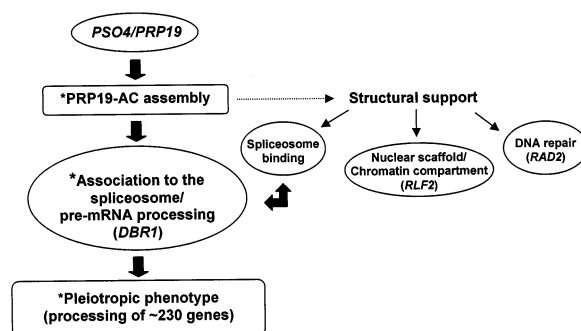
The similarities existing between Prp19p-related proteins of several species (Fig. 5) (60) suggest an important biological function since early evolution. Ranging from 50 to >90%

similarity, the region of the first 130 N-terminal amino acid residues is highly conserved, and the first 140 amino acids are 100% identical in rat, mouse and humans (60). Because of this conserved region, Prp19p has been proposed recently as a member of the U-box protein family (61). Amongst the known homologs, Prp19p/Pso4p of *S.cerevisiae* represents the only thoroughly characterized protein. The N-terminal region of yeast Prp19p is responsible for interaction with itself (homo-oligomerization) and with other proteins of the Prp19-AC (9). The L45S single amino acid substitution of Pso4-1p is located within this region, and this amino acid is conserved in all but one (*Schizosaccharomyces pombe*) of the Prp19p-related proteins (Fig. 5). A computer-based analysis (62) showed a 20% reduced predicted probability of a coil or turn in the secondary structure in the N-terminal domain of the altered Pso4-1p. Indeed the THA confirmed that the Pso4-[L45S] mutation strongly reduces the interaction of Pso4-1p with itself but not with the Prp19-AC stabilizing protein Snt309p (Table 3).

According to Tarn *et al.* (9) homo-oligomerization of Prp19p is a pre-requisite for Prp19-AC assembly. It is now believed that formation of the Prp19-AC involves sequential interactions of its members (11,14). First, the stabilizing protein Snt309p binds to the Prp19p homotetramer, followed by binding of Cef1p; then Ntc30p, Ntc20p, Ntc31p, Ntc77p and Ntc90p interact with each other, building a sub-complex, which binds to Cef1p to form the functional Prp19-AC. By affecting the interaction of Prp19p with itself, the L45S mutation, therefore, confirms the importance of the first 130 N-terminal amino acid residues of Prp19p for homo-oligomerization. Failing in this process it may also indirectly lower the interaction of the complex with other nuclear proteins, thus leading to the observed pleiotropic phenotype of the *pso4-1* mutant. Given its thermoconditional expressivity, one could assume that, at lower temperatures, Pso4-1p might still function in a near-wild-type fashion, while higher temperatures would prevent correct assembly of the Prp19-AC. This hypothesis is supported by the fact that over-expression of the *pso4-1* coding ORF from an *ADHI*-directed expression vector was able to complement growth at restrictive temperatures in a *pso4-1* mutant, an expected result for a temperature-sensitive protein (35–37°C, data not shown).

Using THS we could isolate a set of putative binding partners of Prp19p (Table 4), among them the structure-specific DNA endonuclease Rad2p (30,31), the major subunit (p90) of the yCAF-1, Rlf2p (34) and the lariat-debranching enzyme, Dbr1p (38), but none of the already characterized Prp19-AC components (11). Perhaps our prey library is not representative, or assembly of Prp19-AC relies on indirect interactions, where some of the yeast cell Prp19-AC components would serve as interacting bridges, as these native proteins could bind the bait fusion construct. This last explanation is consistent with the observation that the LexAPRP19/PSO4 bait was able to complement the phenotypes of DNA repair and temperature sensitivity of the *pso4-1* mutant strain (data not shown).

Primarily, the putative Prp19p interactors were evaluated for their ability to bind to the Pso4-1p, where the L45S mutation substantially reduced the activity of the *lacZ* reporter gene. In the same manner, as discussed above, the L45S mutation may interfere with the direct or indirect interaction



**Figure 7.** Hypothetical model for Prp19p/Pso4p functions in the cell. The asterisk indicates the negative effect of Pso4-L45S mutation on PRP19-AC assembly and on pre-mRNA processing. The dotted arrow points to alternative roles with respect to proteins encoded by yeast genes *RAD2*, *DBR1* and *RLF2*.

(via Prp19-AC components) between Pso4-1p and its putative binding partners.

Because *rad2Δ* and *rlf2Δ* mutant strains both display a DNA repair-deficiency phenotype, for example, are sensitive to UVC and to 8-MOP + UVA (31,36,63) (Fig. 6), we checked whether they belonged to the same epistasis group of repair as *PSO4*. The double mutants *rad2Δ/pso4-1* and *rlf2Δ/pso4-1* showed increased sensitivity over the single mutant strains, for both UVC and 8-MOP + UVA (Fig. 6). According to analysis of survival (64) the mutant alleles interacted synergistically for UVC sensitivity (formally indicating competition for the substrate in DNA repair) and showed additivity for 8-MOP + UVA (indicating non-overlap in removal of DNA damage controlled by the two proteins).

Our results are consistent with the proposed function for Prp19p as a spliceosome-associated protein in pre-mRNA processing (11). Regarding DNA repair, impaired processing of pre-mRNA of intron-containing genes, especially those involved in recombination (e.g. *MEI4* and the *recA*-like *MER2/REC107*, *REC114* and *DMC1*), repair (e.g. *MMS2*, *RFA2*, *RAD14* and *KIN28*), cell cycle/chromosomal structure/segregation (e.g. *UBC9*, *GLC7*, *HOP2*, *CIN2*, *MOB1*) (28,44) could lead to the observed phenotypes. As the NER pathway is responsible for most of the UVC-induced repair, impairing its function by blocking expression of genes *RFA2*, *RAD14* and *KIN28* would lead to the observed UVC sensitivity.

The recent characterization of the human hNMP200 ortholog of Pso4p/Prp19p as a component of the nuclear matrix (15) allows us, however, to discuss an additional function for Prp19p. There is mounting evidence that the nuclear matrix is involved in a variety of nuclear processes and in genome maintenance, e.g. DNA replication, DNA repair, transcription and RNA processing (65–76). Like hNMP200, Prp19p could thus be a yeast nuclear matrix protein and, as a member of the nuclear non-chromatin scaffold, it might provide structural support for the RNA processing machinery and for protein complexes engaged in DNA replication, transcription and repair. Thus, the isolation (via THS) of Rad2p, Rlf2p and Dbr1p interacting with Prp19p would be meaningful (see model in Fig. 7). By adopting a biochemical procedure originally developed to identify proteins associated with the nuclear matrix, Park *et al.* (77) could show tight binding of human XPG protein (the yeast Rad2p equivalent) to

this nuclear fraction. As part of yCAF-1 major complex, Rfl2p fulfils its dual role in replication- and repair-coupled chromatin assembly (78,79) and its malfunction renders *rfl2* mutants UVC and 8-MOP + UVA sensitive (Fig. 6). Finally, our isolation of *DBR1* is fully consistent with the functional localization of its encoded protein, a lariat debranching enzyme (38) at splicing sites. Its localization at splicing sites via interaction with Prp19pAC would agree with the proposed dynamics of splicing reactions (11). In view of this, and the results obtained with the *ps04-1* mutant, a possible role of Prp19p/Pso4p as a member of the nuclear scaffold cannot be excluded.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs R. Brent, E. C. Friedberg and C. Guthrie for kindly providing plasmids and strains. L.F.R., J.M.C. and D.B. held fellowships from CNPq. Collaborative research was sponsored by DAAD-CNPq and DAAD-CAPES travel grants to L.F.R., J.S., M.G., H.F., M.B. and J.A.P.H. This work was supported by CNPq, FAPERGS and GENOTOX (Laboratório de Genotoxicidade – UFRGS).

## REFERENCES

- Benathen, A. and Beam, C.A. (1977) The genetic control of X-ray resistance of budding yeast cells. *Radiat. Res.*, **69**, 91–116.
- Henriques, J.A.P., Vicente, E.J., Silva, K.V.C.L. and Schenberg, A.C.G. (1989) PSO4: a novel gene involved in error-prone repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.*, **218**, 111–124.
- Henriques, J.A.P., Brozmanová, J. and Brendel, M. (1997) Role of PSO genes in the repair of photoinduced interstrand cross-links and photooxidative damage in the DNA of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Photochem. Photobiol. B*, **39**, 185–196.
- Morais, M.A., Jr, Brozmanová, J., Benfato, M., Duraj, J., Vlcková, V. and Henriques, J.A.P. (1994) The *E.coli recA* gene can restore the defect in mutagenesis of the *ps04-1* mutant of *S.cerevisiae*. *Mutat. Res.*, **314**, 209–220.
- Grey, M., Düsterhöft, A., Henriques, J.A.P. and Brendel, M. (1996) Allelism of PSO4 and PRP19 links pre-mRNA processing with recombination and error-prone DNA-repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4009–4014.
- Tarn, W.-Y., Lee, K.-R. and Cheng, S.-C. (1993) PRP19: a novel spliceosomal component. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 1883–1891.
- Tarn, W.-Y., Lee, K.-R. and Cheng, S.-C. (1993) Yeast precursor mRNA processing protein PRP19 associates with the spliceosome concomitant with or just after dissociation of U4 small nuclear RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 10821–10825.
- Tarn, W.-Y., Lee, K.R. and Cheng, S.C. (1993) The yeast PRP19 protein is not tightly associated with small nuclear RNAs, but appears to associate with the spliceosome after binding of U2 to the pre-mRNA and prior to formation of the functional spliceosome. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 1883–1891.
- Tarn, W.-Y., Hsu, C.-H., Huang, K.-T., Chen, H.-R., Kao, H.-Y., Lee, K.-R. and Cheng, S.-C. (1994) Functional association of essential splicing factor(s) with PRP19 in a protein complex. *EMBO J.*, **13**, 2421–2431.
- Tsai, W.-Y., Chow, Y.-T., Chen, H.-R., Huang, K.-T., Hong, R.-I., Jan, S.-P., Kuo, N.-Y., Tsao, T.Y., Chen, C.-H. and Cheng, S.-C. (1999) Cef1p is a component of the Prp19p-associated complex and essential for pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.*, **274**, 9455–9462.
- Chen, C.-H., Yu, W.-C., Tsao, T.Y., Wang, L.-Y., Chen, H.-R., Lin, J.-Y., Tsai, W.-Y. and Cheng, S.-C. (2002) Functional and physical interactions between components of the Prp19p-associated complex. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1029–1037.
- Chen, H.-R., Jan, S.-P., Tsao, T.Y., Sheu, Y.-J., Banroques, J. and Cheng, S.-C. (1998) Snt309p, a component of the Prp19p-associated complex that interacts with Prp19p and associates with the spliceosome simultaneously with or immediately after dissociation of U4 in the same manner as Prp19. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 2196–2204.
- Chen, H.-R., Tsao, T.Y., Chen, C.-H., Tsai, W.-Y., Her, L.-S., Hsu, M.M.-T. and Cheng, S.-C. (1999) Snt309p modulates interactions of Prp19p with its associated components to stabilize the Prp19p-associated complex essential for pre-mRNA processing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 5406–5411.
- Chen, C.-H., Tsai, W.-Y., Chen, H.-R., Wang, C.-H. and Cheng, S.-C. (2001) Identification and characterization of two novel components of the Prp19p-associated complex, Ntc30p and Ntc20p. *J. Biol. Chem.*, **276**, 488–494.
- Gotzmann, J., Gerner, C., Meissner, M., Holzmann, K., Grimm, R., Mikulits, W. and Sauermaun, G. (2000) hNMP200: a novel human common nuclear matrix protein combining structural and regulatory functions. *Exp. Cell Res.*, **261**, 166–179.
- Fields, S. and Song, O.K. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245–246.
- Umen, J.G. and Guthrie, C. (1995) A novel role for a U5 snRNP protein in 3' splice site selection. *Genes Dev.*, **9**, 855–868.
- Lesser, C.F. and Guthrie, C. (1993) Mutational analysis of pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae* using a sensitive new reporter gene. *CUP1. Genetics*, **133**, 851–863.
- Rose, M.D., Winston, F. and Hieter, P. (1990) *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., More, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*, 3rd Edn. Wiley, USA.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H. and Brent, R. (1993) Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell*, **75**, 791–803.
- Chowdhury, S., Smith, K.W. and Gustin, M.C. (1992) Osmotic stress and the yeast cytoskeleton: phenotype-specific suppression of an actin mutation. *J. Cell Biol.*, **118**, 561–571.
- Neff, N.F., Thomas, J.H., Grisafi, P. and Botstein, D. (1983) Isolation of the beta-tubulin gene from yeast and demonstration of its essential function *in vivo*. *Cell*, **33**, 211–219.
- Lussier, M., White, A.M., Sheraton, J., diPaolo, T., Treadwell, J., Southard, S.B., Horenstein, C.I., Chen, Weiner, J., Ram, A.F.J., Kapteyn, J.C. et al. (1997) Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **147**, 435–450.
- Henriques, J.A.P. and Moustacchi, E. (1980) Isolation and characterization of *ps0* mutants sensitive to photoaddition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **95**, 273–288.
- Watt, P.M., Louis, E.J., Borts, R.H. and Hickson, I.D. (1995) Sgs1: a eukaryotic homolog of *E. coli* RecQ that interacts with topoisomerase II *in vivo* and is required for faithful chromosome segregation. *Cell*, **81**, 253–260.
- Mewes, H.W., Frishman, D., Gruber, C., Geier, B., Haase, D., Kaps, A., Lemcke, K., Mannhaupt, G., Pfeiffer, F., Schuller, C., Stocker, S. and Weil, B. (2000) MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 37–40.
- Bankmann, M., Prakash, L. and Prakash, S. (1992) Yeast *RAD14* and human xeroderma pigmentosum group A DNA-repair genes encode homologous proteins. *Nature*, **355**, 555–558.
- Higgins, D.R., Prakash, L., Reynolds, P. and Prakash, S. (1984) Isolation and characterization of the *RAD2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **30**, 121–128.
- Araujo, S.J. and Wood, R.D. (1999) Protein complexes in nucleotide excision repair. [Erratum (2000) *Mutat. Res.*, **459**, 171–172.] *Mutat. Res.*, **435**, 23–33.
- Habraken, Y., Sung, P., Prakash, S. and Prakash, L. (1996) Transcription factor TFIIH and DNA endonuclease Rad2 constitute yeast nucleotide excision repair factor 3: implications for nucleotide excision repair and Cockayne syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 10718–10722.
- Enomoto, S., McCune-Zierath, P.D., Gerami-Nejad, M., Sanders, M.A. and Berman, J. (1997) RLF2, a subunit of the yeast chromatin assembly factor-I, is required for telomeric chromatin function *in vivo*. *Genes Dev.*, **11**, 358–370.
- Kaufman, P.D., Kobayashi, R. and Stillman, B. (1997) Ultraviolet radiation sensitivity and reduction of telomeric silencing in



- Saccharomyces cerevisiae* cells lacking chromatin assembly factor-I. *Genes Dev.*, **11**, 345–357.
35. Enomoto, S. and Berman, J. (1998) Chromatin assembly factor I contributes to the maintenance, but not the re-establishment, of silencing at the yeast silent mating loci. *Genes Dev.*, **12**, 219–232.
  36. Game, J.C. and Kaufman, P.D. (1999) Role of *Saccharomyces cerevisiae* chromatin assembly factor-I in repair of ultraviolet radiation damage *in vivo*. *Genetics*, **151**, 485–497.
  37. Friedberg, E.C., Walker, G.C. and Siede, W. (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington, DC.
  38. Chapman, K.B. and Boeke, J.D. (1991) Isolation and characterization of the gene encoding yeast debranching enzyme. *Cell*, **65**, 483–492.
  39. Vijayraghavan, U., Company, M. and Abelson, J. (1989) Isolation and characterization of pre-mRNA splicing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, **3**, 1206–1216.
  40. Schwob, E. and Martin, R.P. (1992) New yeast actin-like gene required late in the cell cycle. *Nature*, **355**, 179–182.
  41. Feng, Z.H., Wilson, S.E., Peng, Z.Y., Schlender, K.K., Reinmann, E.M. and Trumbly, R.J. (1991) The yeast *GLC7* gene required for glycogen accumulation encodes a type 1 protein phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **266**, 23796–23801.
  42. Ng, R. and Abelson, J. (1980) Isolation and sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **77**, 3912–3916.
  43. Schatz, P.J., Solomon, F. and Botstein, D. (1986) Genetically essential and nonessential alpha-tubulin genes specify functionally interchangeable proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3722–3733.
  44. Costanzo, M.C., Crawford, M.E., Hirschman, J.E., Kranz, J.E., Olsen, P., Robertson, L.S., Skrzypek, M.S., Braun, B.R., Hopkins, K.L., Kondu, P. et al. (2001) YPD™, PombePD™ and WormPD™: model organism volumes of the BioKnowledge™ library, an integrated resource for protein information. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 75–79.
  45. Broomfield, S., Chow, B.L. and Xiao, W. (1998) *MMS2*, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 5678–5683.
  46. Tijsterman, M., Tasseron de Jong, J.G., Verhage, R.A. and Brouwer, J. (1998) Defective Kin28, a subunit of yeast TFIIF, impairs transcription-coupled but not global genome nucleotide excision repair. *Mutat. Res.*, **409**, 181–188.
  47. Guzder, S.N., Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L. and Prakash, S. (1995) Reconstitution of yeast nucleotide excision repair with purified Rad proteins, replication protein A, and transcription factor TFIIF. *J. Biol. Chem.*, **270**, 12973–12976.
  48. He, Z., Wong, J.M.S., Maniar, H.S., Brill, S.J. and Ingles, C.J. (1996) Assessing the requirements for nucleotide excision repair proteins of *Saccharomyces cerevisiae* in an *in vitro* system. *J. Biol. Chem.*, **271**, 28243–28249.
  49. Sugiyama, T., Zaitseva, E.M. and Kowalczykowski, S.C. (1997) A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein. *J. Biol. Chem.*, **272**, 7940–7945.
  50. Hays, S.L., Firmenich, A.A., Massey, P., Banerjee, R. and Berg, P. (1998) Studies of the interaction between Rad52 protein and the yeast single stranded DNA binding protein RPA. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 4400–4406.
  51. Menees, T.M., Ross-MacDonald, P.B. and Roeder, G.S. (1992) *MEI4*, a meiosis-specific yeast gene required for chromosome synapsis. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 1340–1351.
  52. Nag, D.K., Scherthan, H., Rockmill, B., Bhargava, J. and Roeder, G.S. (1995) Heteroduplex DNA formation and homolog pairing in yeast meiotic mutants. *Genetics*, **141**, 75–86.
  53. Hoyt, M.A., Stearns, T. and Botstein, D. (1990) Chromosome instability mutants of *Saccharomyces cerevisiae* that are defective in microtubule-mediated processes. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 223–234.
  54. Leu, J.Y., Chua, P.R. and Roeder, G.S. (1998) The meiosis-specific Hop2 protein of *S.cerevisiae* ensures synapsis between homologous chromosomes. *Cell*, **94**, 375–386.
  55. Leu, J.Y. and Roeder, G.S. (1999) The pachytene checkpoint in *S.cerevisiae* depends on Swel-mediated phosphorylation of the cyclin-dependent kinase Cdc28. *Mol. Cell*, **4**, 805–814.
  56. Bishop, D.K., Park, D., Xu, L. and Kleckner, N. (1992) *DMC1*: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli recA* required for recombination, synaptonemal complex formation and cell cycle progression. *Cell*, **69**, 439–456.
  57. Rockmill, B., Engebrecht, J.A., Scherthan, H., Loidl, J. and Roeder, G.S. (1995) The yeast *MER2* gene is required for chromosome synapsis and the initiation of meiotic recombination. *Genetics*, **141**, 49–59.
  58. Malone, R.E., Bullard, S., Hermiston, M., Rieger, R., Cool, M. and Galbraith, A. (1991) Isolation of mutants defective in early steps of meiotic recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **128**, 79–88.
  59. Johzuka, K. and Ogawa, H. (1995) Interaction of Mre11 and Rad50: two proteins required for DNA repair and meiosis-specific double-strand break formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **139**, 1521–1532.
  60. Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. and Rapp, B.A. (2000) GenBank. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 15–18.
  61. Ohi, M.D. and Gould, K.L. (2002) Characterization of interactions among the Cef1p-Prp19p-associated splicing complex. *RNA*, **8**, 798–815.
  62. King, R.D. and Sternberg, M.J. (1996) Identification and application of the concepts important for accurate and reliable protein secondary structure prediction. *Protein Sci.*, **5**, 2298–2310.
  63. Meniel, V., Magaña-Schwencke, N. and Averbek, D. (1995) Preferential repair in *Saccharomyces cerevisiae rad* mutants after induction of interstrand cross-links by 8-methoxypsoralen plus UVA. *Mutagenesis*, **10**, 543–548.
  64. Brendel, M. and Haynes, R.H. (1973) Interactions among genes controlling sensitivity to radiation and alkylation in yeast. *Mol. Gen. Genet.*, **125**, 197–216.
  65. Pederson, T. (1998) Thinking about a nuclear matrix. *J. Mol. Biol.*, **277**, 147–159.
  66. Martini, E., Roche, D.M., Marheineke, K., Verreault, A. and Almouzni, G. (1998) Recruitment of phosphorylated chromatin assembly factor 1 to chromatin after UV irradiation of human cells. *J. Cell Biol.*, **143**, 563–575.
  67. Ridgway, P. and Almouzni, G. (2000) CAF-1 and the inheritance of chromatin states: at the crossroads of DNA replication and repair. *J. Cell Sci.*, **113**, 2647–2658.
  68. Bode, J., Benham, C., Ernst, E., Knopp, A., Marschalek, R., Strick, R. and Strissel, P. (2000) Fatal connections: when DNA ends meet on the nuclear matrix. *J. Cell. Biochem.*, **35** (suppl.), 3–22.
  69. Brown, K. (1999) Nuclear structure, gene expression and development. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **9**, 203–212.
  70. Pederson, T. (2000) Half a century of ‘the nuclear matrix’. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 799–805.
  71. van Driel, R., Wansink, D.G., van Steensel, B., Grande, M.A., Schul, W. and de Jong, L. (1995) Nuclear domains and the nuclear matrix. *Int. Rev. Cytol.*, **162A**, 151–189.
  72. Martelli, A.M., Cocco, L., Riederer, B.M. and Neri, L.M. (1996) The nuclear matrix: a critical appraisal. *Histol. Histopathol.*, **11**, 1035–1048.
  73. Kamiuchi, S., Saijo, M., Citterio, E., de Jager, M., Hoeijmakers, J.H. and Tanaka, K. (2002) Translocation of Cockayne syndrome group A protein to the nuclear matrix: possible relevance to transcription-coupled DNA repair. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 201–206.
  74. Balajee, A.S., Dianova, I. and Bohr, V.A. (1999) Oxidative damage-induced PCNA complex formation is efficient in xeroderma pigmentosum group A but reduced in Cockayne syndrome group B cells. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 4476–4482.
  75. Erdemir, T., Bilican, B., Oncel, D., Goding, C.R. and Yavuzer, U. (2002) DNA damage-dependent interaction of the nuclear matrix protein C1D with translin-associated factor X (TRAX). *J. Cell Sci.*, **115**, 207–216.
  76. Lechner, M.S., Levitan, I. and Dressler, G.R. (2000) PTIP, a novel BRCT domain-containing protein interacts with Pax2 and is associated with active chromatin. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 2741–2751.
  77. Park, M.S., Knauf, J.A., Pendergrass, S.H., Coulon, C.H., Strniste, G.F., Marrone, B.L. and MacInnes, M.A. (1996) Ultraviolet-induced movement of the human DNA repair protein, *Xeroderma pigmentosum* type G, in the nucleus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 8368–8373.
  78. Zhang, Z., Shibahara, K. and Stillman, B. (2000) PCNA connects DNA replication to epigenetic inheritance in yeast. *Nature*, **408**, 221–225.
  79. Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. and Sakaki, Y. (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 4569–4574.

## **CAPÍTULO III**

**“Further Characterization of the Yeast Repair Gene  
*PSO2/SNM1*: New phenotypes, Isolation of Potential  
Binding Partners of Pso2p and Genetic Interaction after  
DNA Damage Treatments”**

**(Submetido à revista DNA Repair)**

**Further Characterization of the Yeast Repair Gene *PSO2/SNM1*:  
New phenotypes, Isolation of Potential Binding Partners of Pso2p and  
Genetic Interaction after DNA Damage Treatments**

**L.F. Revers<sup>a</sup>, M. Strauss<sup>b</sup>, H. Feldmann<sup>c</sup>, M. Brendel<sup>a</sup>, J. A. P. Henriques<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup>Depto. de Biofísica / Centro de Biotecnologia –IB-UFRGS  
Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 4321, Campus do Vale  
91501-907 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Institut für Mikrobiologie, Abtlg. Biologie f. Mediziner  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Theodor-Stern-Kai 7, Haus 75  
60590 Frankfurt/Main, Germany

<sup>c</sup>Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians Universität, München  
Feodor-Lynen-Str.25  
81377 München, Germany

\*to whom correspondence should be addressed

## Abstract

The exact mechanism of interstrand cross-link (ICL) repair in yeast is still not well understood. By identifying new phenotypes and isolating putative binding partners through the two-hybrid system we further extended the characterization of the specific ICL repair gene *PSO2*. Treatments with the glycolytic metabolite acetaldehyde (ACA) was shown to be more toxic to *pso2* mutants than to the corresponding WT, and also capable to induce a *PSO2-lacZ* fusion promoter by a factor comparable to that found for known DNA interstrand cross-link inducing treatments, thus indicating that the natural metabolite ACA might form ICL in yeast DNA. Isolation of potential binding partners of Pso2p using the two hybrid system identified nine different fusion protein products, among them part of the protein kinase Pak1p, a temperature-sensitive suppressor of DNA Polymerase  $\alpha$  mutations. Pak1p interacted with the C-terminal conserved region of Pso2p, a domain recently named  $\beta$ -CASP among the known Pso2p-like orthologues. Integrity of the  $\beta$ -CASP domain was shown to be essential for WT-like DNA repair in *pso2* $\Delta$  complementation assays. The comparison of mutagen-sensitivity phenotypes of *pso2* $\Delta$  and *pak1* $\Delta$  single as well as the *pso2* $\Delta$  *pak1* $\Delta$  double mutant revealed that *PAK1* is necessary for complete WT-like repair. The epistatic interaction of both mutant alleles in the double mutant suggests that Pak1p has a role in the same repair pathway to which *PSO2* belongs and that *PAK1* indeed is a repair gene.

Key words: DNA repair, interstrand crosslink, two hybrid system, acetaldehyde, *Saccharomyces cerevisiae*

## Introduction

DNA interstrand cross-links (ICLs) covalently link the two complementary DNA single strands thereby preventing strand separation which results in blocked transcription and DNA replication, and ultimately forbids segregation of DNA and chromosomes. In bacterial and yeast cells, the presence of one non-repaired ICL can be lethal (1, 2, 3). Due to their extreme genotoxicity, agents that induce ICLs in DNA are widely used in anti-tumor and in phototherapy. Examples include cisplatin, mitomycin C, sulphur and nitrogen mustards and its derivatives, such as melphalan and cyclophosphamide, and photoactivated bifunctional psoralens. Most of these agents cause a number of different lesions in DNA, including monoadducts, DNA-protein cross-links, and DNA intra- and interstrand strands cross-links (ICLs). The latter constitute the most toxic DNA lesion and, therefore, the main cause of cell death, although they sometimes amount to only a small fraction of the total number of DNA adducts formed by a bi- or polyfunctional chemical (c.f. review 2, 3 and 4).

The mechanism of ICL repair in yeast was partially elucidated by isolating genes specifically involved in ICL repair (5, 6, 7). A large number of repair genes influence sensitivity to ICL-forming treatments, amongst them many genes of the RAD3 and RAD6 epistasis groups of DNA repair (1, 2, 8, 9, 10) but only the mutant alleles of the yeast gene *PSO2* (allelic to *SNM1*, 11) have been found to be specifically sensitive to all treatments inducing ICL lesions in DNA (13). Many other *snm* and *pso* mutants have been isolated after screening for strains with increased sensitivity to nitrogen mustard (HN2) and photoactivated 8-methoxypsoralen (8MOP+UVA), respectively (5, 6, 7) but none of them exhibits such specific sensitivity to ICL-forming treatments as mutant alleles of *PSO2/SNM1* (6, 12, 13). Recently, in order to avoid confusion with other *snm1* isolates in the yeast *S. cerevisiae* we have, according to the suggestions of the Stanford yeast group, introduced a new *PSO2* nomenclature that unifies *snm1* and *pso2* mutant alleles (3).

Gene *PSO2* encodes 76 kDa nuclear protein (14, 15, 16). In contrast to their extremely high sensitivity to ICL generating treatments *pso2* mutants are only mildly sensitive to mono-functional alkylating agents and to UV-light of 254nm (UVC) and are not hypersensitive to gamma rays (4, 5). In exponentially growing cells, expression of *PSO2* can be induced by ICL-forming agents or by UVC but not by the mono-functional alkylating agent MMS and by the UVC mimeticum 4NQO (17) and induction is controlled by the *DUNI*-encoded kinase (18). Overexpression of *PSO2* does not lead to an increased resistance to nitrogen mustard and cisplatin but, to the contrary, results in slightly increased sensitivity of the transformants to

these mutagens (19).

Analysis of DNA repair in 8-MOP+UVA, HN2 and cisplatin-treated *pso2-1* and *pso2-11* mutants showed that incision near ICL, and also excision of this DNA damage proceeds WT-like but that a late step in ICL repair, necessary to reconstitute high m.w. DNA from low m.w. DNA generated by earlier incision/excision events, is failing (12, 20). The blocking of recombinational, of non-homologous end-joining, and of error-prone repair inhibits repair of HN2- and cisplatin-induced ICLs, indicating that all three modes of repair are involved in removal of this DNA lesion (21, 22). However, contribution to repair of a particular pathway is cell-cycle dependent (21).

Many genes involved in DNA damage repair are conserved from bacteria via yeast to higher eukaryotes (23). Accordingly, *SNM1/PSO2* homologs have been found in mammals and humans. The putative human cross-link repair gene *KIAA0086*, based on its homology with yeast *PSO2* locus, makes it a likely candidate for a DNA repair gene (24). Mouse embryonic stem cells with a *PSO2* (-/-) genotype are mitomycin C sensitive but not to other ICL-inducing agents (25). The recent linking of mutant alleles of the human *ELAC2* and *Artemis* genes, encoding Pso2p-like proteins, with hereditary pre-disposition for prostate cancer and severe immune deficiency and radiosensitivity due to defects in V(D)J recombination respectively, points to a contribution of human *PSO2*-like genes to DNA or chromosome stability and genome integrity in man (26, 27). More recently, the conserved region concentrated at the C-terminal half of most Pso2p-like orthologues was named  $\beta$ -CASP motif after metallo- $\beta$ -lactamase-associated CPSF *Artemis* *SNM1/PSO2* and constitutes a new family of enzymes involved in nucleic acid metabolism (28).

Several proteins encoded by genes of the three epistasis groups of yeast DNA repair are involved in ICL repair (2, 3, 8, 21, 22). The exact mechanism of ICL repair is still not understood, though it seems clear that the enzymes of nucleotide excision repair (NER) start processing ICL-containing DNA and that the block in *pso2* mutants is at a post-incision step (and probably at a post excision step as well) although the role of Pso2p in the removal of ICLs and/or in reconstituting high m.w. DNA is not well defined. A clarification of the role of Pso2p in ICL-repair in yeast could be facilitated by knowing its interaction with other proteins. Therefore, in addition to further characterizing new phenotypes for *pso2* mutants, we have initiated a screen for potential Pso2p binding partners using the yeast two-hybrid system.

## Material and Methods

### *Yeast strains*

The isogenic yeast strains used in this study are listed in Table 1. Phenotypes of the haploid ascospore-derived strains were determined by establishing the respective deletion markers: geneticin resistance (*YER129w::kanMX4*) and uracil prototrophy (*pso2::URA3*).

### *Genetic and molecular biological methods*

Techniques in yeast genetics were according to Rose *et al.* (29) and standard molecular techniques were performed according to Sambrook *et al.* (30) and Ausubel *et al.* (31).

### *E. coli strains and plasmids*

*Escherichia coli* strains XL1-blue (Stratagene), KC8 (32), and TOP10 (Invitrogen) were used as recipients for cloning procedures. The following constructions were used: *LexAPSO2-A* (contains the *SNMI/PSO2* coding ORF from amino acid 47 to 661, in frame fused to the LexA DNA binding domain of pEG202 using an internal *EcoRI* restriction site); *LexAPSO2-B* (contains the *SNMI/PSO2* coding ORF from amino acid 47 to 466, in frame fused to the LexA DNA binding domain of pEG202 using two internal *EcoRI* restriction sites). pMS3141I containing the *PSO2* coding ORF disrupted with *URA3* was used to obtain isogenic *pso2Δ* strains by single step gene replacement (33).

### *Media and growth conditions*

Yeast strains were grown in YEPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) at 30°C. For selective growth, either YEPD plus geneticin (G418, Calbiochem) 0.2 mg/mL or SynCo (0.67% yeast nitrogen base from DIFCO/USB, 2% glucose, 1% ammonium sulfate) supplemented with the appropriate essential nutrients (40 µg/mL) was used. For detection of canavanine-resistant mutants, canavanine sulfate (Sigma) was added at 40 µg/mL to appropriately supplemented SynCo media. The sporulation medium (KAC) contained 1% potassium acetate, 0.1% yeast extract and 0.05% glucose. Diploids were sporulated on KAC agar for 3-5 days. Sporulation efficiency was calculated by microscopically determining the frequency of asci in a counting chamber. Medium for Petri dishes was solidified with 2 % agar.

### *Chemical and mutagen treatments.*

Acetaldehyde stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  (ACA; purchased from Sigma) was injected via an ice-cold plastic syringe into small ice-cold rubber-sealed glass vials containing the cell suspension in exponential phase of growth ( $\sim 10^7$  cells/mL) at given doses (see graph Figure 1). After 30 min treatment at  $30^{\circ}\text{C}$  cells were spread immediately in triplicate on YEPD plates and incubated at  $30^{\circ}\text{C}$  for 3 days.

Bleomycin (purchased from Calbiochem) was dissolved in water at a concentration of 10mg/mL, filter-sterilized and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  prior to use. YEPD plates containing bleomycin were prepared by diluting the bleomycin solution at given concentrations in warm YEPD (see Figure 2). The plates were stored overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  before use.

UVC: different concentrations of cells in exponential phase of growth ( $\sim 10^7$  cells/mL) were spread immediately in triplicate on YEPD plates and, after drying, irradiated with UVC (Stratalinker, Stratagene) with doses ranging from 0 to  $60 \text{ J/m}^2$ . For drop tests, stationary cultures were serially diluted in 1:10 steps and 5 or 10  $\mu\text{L}$  aliquots were then spotted onto YEPD medium. After drying the plates were UVC-irradiated as described above.

8-MOP+UVA: suspensions of  $5 \times 10^6$  cells/mL in exponential phase were treated with photo-activated 8-methoxypsoralen (8-MOP+UVA; Sigma) according to Henriques and Moustacchi (5). After dilution and plating all plates were incubated for 3-5 d at the appropriate temperature in the dark. Survival data represent the average of at least three experiments.

### *Two-hybrid analysis*

Two-hybrid analysis was essentially as described by Gyuris *et al.* (32). Two in-frame fusions of the *PSO2* ORF to the LexA DNA binding domain plasmid (pEG202) were constructed for the screening and interaction analysis using the two hybrid system. The *LexAPSO2-A* fusion contains the portion from aa 47 to 661 and the *LexAPSO2-B* is a truncated construction from aa 47 to 466, lacking the last 195 C-terminal part. Both were constructed using internal *EcoRI* restrictions sites and displayed no intrinsic transcriptional activation when transformed into strains containing reporter constructs regulated by LexA DNA-binding sites.

Yeast strain EGY48 containing the reporter plasmid pSH18-34 and the bait plasmid LexAPSO2-A was transformed with a yeast genomic library cloned into the prey plasmid pJG4-5 (34). Plasmids were isolated from yeast that survived selection for leucine prototrophy on galactose and showed *lacZ* expression on X-Gal-galactose plates. *E. coli*



strain K12 KC8 *pyrF::Tn5, hsdR, leuB600, trpC9830, lacD74, strA, galK, hisB436* was used for the rescue of the plasmids as described by Gyuris *et al.* (32). Plasmid DNA was sequenced with an Applied Biosystems sequencer A377 (Foster City, CA). All obtained sequences were submitted to a Blast search at MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences) (35). The expression of the LexA fusion baits were analyzed by western blotting using a monoclonal antibody against LexA (Clontech Laboratories Inc.) and with complementation assays in *pso2Δ* mutants.

$\beta$ -galactosidase activity of the pSH18-34 two-hybrid reporter plasmid was assayed and quantified according to Ausubel *et al.* (31) using exponential phase cultures (approx.  $2 \times 10^7$  cells/mL). Three to four individual transformants were assayed in liquid SC that lacked the appropriate nutrients.

#### *ACA-induced expression assay of PSO2*

Induction of *PSO2* expression after ACA treatment was followed using the *PSO2lacZ* fusion construct contained in plasmid pRW6 (17) by assaying  $\beta$ -galactosidase activity as described by Wolter *et al.* (17).

## **Results**

### ***The pso2 mutant is sensitive to the glycolytic metabolite acetaldehyde***

As a facultative anaerobic organism *S. cerevisiae* can metabolize carbon sources aerobically as well as anaerobically. When aerobically grown in sugar-rich media yeast will degrade glucose by fermentation (glucose repression) and will not activate oxidative phosphorylation in the mitochondria. Instead it will produce ethanol and glycerol, both of which are excreted into the medium. After sugar depletion yeast will adapt to aerobic metabolism of carbon sources (glucose de-repression during diauxic shift, (36) and then aerobically utilize these excretion products as carbon and energy source. As one of the most toxic metabolites in the glycolytic process acetaldehyde (ACA) is reduced to ethanol by alcohol dehydrogenases. With a melting temperature of  $-123.5^\circ\text{C}$  and a boiling temperature of  $21.3^\circ\text{C}$  (Merck Index) ACA may rapidly diffuse throughout the cell. ACA is highly reactive and, amongst adducts with guanine, cytosine and adenine of DNA (37), has been shown to form intra- and interstrand cross-links in DNA (37, 38). Exogenously added ACA is toxic to yeast (39) and *pso2* mutants are more sensitive than the corresponding *PSO2* WT (Figure 1A). The sugar metabolite ACA may thus be a naturally occurring intracellular ICL-

forming agent and hence Pso2p may have a function in preventing accumulation of metabolically induced lethal ICL in the yeast DNA.

To further substantiate the role of ICL repair gene *PSO2* for repair of ACA-induced DNA damage, we have measured the induction of this gene in response to ACA treatment. *PSO2* is selectively inducible by ICL forming treatments, e.g. exposure to nitrogen mustard (HN2), cisDDP, 8MOP+UVA and by UVC and non-inducible by treatments with monofunctional mutagens, e.g. nitrogen half mustard (HN1), MMS or 4-NQO (17). Figure 1B shows the relative expression of  $\beta$ -galactosidase encoded in a *PSO2-lacZ* fusion construct in exponentially growing yeast after treatment with HN2, ACA, UVC, HN1 or 4-NQO. The induction factor is the relative increase in expression of  $\beta$ -galactosidase in treated as compared to untreated cultures. It is obvious that ACA induces about three-fold the expression of  $\beta$ -galactosidase encoded in the *PSO2-lacZ* fusion construct. The induction factor is comparable to that found after treatment with HN2 (17). No induction of *PSO2-lacZ* fusion was detectable after treatment with monofunctional agents HN1 or 4-NQO.

#### ***Isolation of potential molecular partners of Pso2p using the two hybrid system***

A two hybrid screen was used to identify proteins that may physically interact with Pso2p. The full complementing *LexAPSO2-A* bait (c.f. Figure 2) was used in the screening and a population of  $2 \times 10^6$  independent transformants was obtained after transformation with the prey library. Aliquots were pooled and plated on selective medium containing galactose for induced expression of the activation domain fusion library. Some 320 clones were identified that allowed growth on SD-Leu as a result of the activation of the LexAop::*LEU2* reporter construct. These clones were colony-purified, molecularly characterized by restriction mapping, and re-tested after re-transformation for their ability to activate Gal-inducible transcription of two reporter constructs (*LexAop>::LEU2* and *pSH18-34*; 32). We found 47 transformants containing putative interactors, able to activate transcription of the two independent reporter constructs in the presence of *LexA-PSO2-A*. Further sequencing of the library plasmids revealed 13 different fusion protein products with four of them containing no real ORF sub-fragments or incorrect orientation. The remaining 9 different fusion protein products were unable to induce transcription when co-expressed with unrelated LexA DNA-binding domain fusions (*pRFHM1*; 32, *LexAPSO5* - yeast *RAD16* allele and *LexAHDF1* - yeast Ku70 protein), indicating that the interaction with *LexA-PSO2-A* was specific. (c.f. Table 2). Four of these putative Pso2p interacting proteins are encoded by ORFs with as yet

unknown function. The remaining five interacting proteins are encoded by the genes *NRK1*, *PAK1*, *APL6*, *FIR1* and *IFH1* and their encoded proteins can roughly be grouped into four functional classes: (a) cell cycle and cell wall maintenance (*NRK1*); (b) DNA synthesis (*PAK1*); (c) RNA metabolism (*FIR1* and *IFH1*) and (d) an APL3-complex associated protein (*APL6*).

After literature investigation, we focused our efforts on the study of Pso2p interaction with the 3 most relevant candidates, corresponding to the genes *PAK1*, *YHR080c* and *YJL084c*. Encoding a protein kinase capable of suppressing DNA polymerase alpha mutations, *PAK1* was suggested to modify/stabilize thermo-labile DNA polymerases during DNA repair (40). *YHR080c* and *YJL084c* encode proteins of as yet unknown function but were shown to be transcriptionally inducible by MMS treatment by a factor of 6.2 and 1.7, respectively (41). The C-terminal third of the *PAK1* gene coding region was independently isolated 6 times via THS whereas *YHR080c* and *YJL084c* were isolated only once. The domain isolated in the fusion protein encoded by *PAK1* is preceded by the kinase consensus motifs (amino acids 131-450; 40) and corresponds to the last C-terminal third of the protein (amino acids 618-1142). Using this part of the *PAK1* coding region as query, the non-redundant base (NRDB) and domain databases at NCBI were searched using PSI-BLAST and RPS-BLAST, respectively, and no significant similarity to known deposited domains/proteins were highlighted within this region. Applying the same approach, the isolated *YHR080c* and *YJL084c* ORF sub-fragments were searched, revealing that *YHR080c* belongs the recently defined family of GRAM proteins (GRAM motif from amino acid 548-617; 42) while no significant similarities were found with the *YJL084c* sub-fragment. GRAM stands for **g**lucosyltransferases, **R**ab-like GTPase activators and **m**ytotubularins. This domain is generally ~70 amino acids in length and was predicted to be an intracellular protein-binding or lipid-binding signalling domain probably in membrane-associated processes (42).

### ***Pak1p and Yhr080cp interact through the conserved C-terminal $\beta$ -CASP domain of Pso2p***

With the aim to investigate the Pso2p domain involved in the interaction with its putative binding partners Pak1p, Yjl084cp and Yhr080cp, we firstly tested the ability of these prey-fusion proteins to induce the expression of *lacZ* and *LEU* reporters in the presence of the full *PSO2* complementing bait LexAPSO2-A and the truncated construction LexAPSO2-B lacking the C-terminal 195 amino acids. As shown in Figure 2 deletion of the last 195 amino acids within the  $\beta$ -CASP domain in LexAPSO2-B fails to complement *pso2* $\Delta$  mutant strains

and, therefore, was used to determine if the conserved  $\beta$ -CASP domain, essential for WT-like DNA repair, also mediates interaction between its potential molecular partners. The *YJL084c* prey fusion product was able to activate both reporters (*lacZ* and *LEU*) in the presence of both *PSO2* baits (LEU prototrophy and blue colour in SynCo media containing galactose) whereas interaction of YHR080c and PAK1 prey fusion products with LexAPSO2-B was considerably reduced (Table 3). This implies that the deletion of the last 195 amino acids within the conserved  $\beta$ -CASP domain specifically affects the interaction between Pso2p with the prey fusions encoded by *PAK1* and YHR080c. Figure 3 shows a multiple protein alignment of this recently characterized domain amongst potential orthologues of *PSO2* in various organisms, where the deleted portion of *LexAPSO2 B* bait is highlighted. Interestingly, besides the three characteristic conserved polar amino acids constituting motifs A, B and C (28), another polar amino acid residue (histidine 502 in Pso2p) was found to be conserved in a predicted extended strand region within aa sequence 491-509 that has significant similarity in all Pso-like proteins but one, the human Artemis protein.

#### ***Genetic interaction between PSO2 and PAK1 after induced DNA damage***

In order to study the nature of the interactions found between *PSO2*, *PAK1*, *YJL084c* and *YHR080c* we have firstly tested single mutants of the selected *PSO2* putative interactors for their sensitivity to some DNA damaging chemicals (8-MOP+UVA, UVC, MMS, Trenimon, HN2). The single mutant haploid strains *yjl084c* $\Delta$  and *yhr080c* $\Delta$  showed no sensitivity to any of the chemicals tested (data not shown and M. Strauss, unpublished data) whereas the *pak1* $\Delta$  strain showed sensitivity to UVC and 8MOP+UVA. Since all *pso2* mutant alleles confer high sensitivity to the cross-linking photo-activated psoralen 8-MOP and are only moderately sensitive to UVC (1, 4, 5, 6), survival was determined in single and double mutants after both treatments. Survival curves in Figure 4 show that the *pak1* $\Delta$  mutant strain is sensitive to both treatments and that combination of the two mutant alleles renders double mutants with a *pso2* $\Delta$ -like sensitivity phenotype, implying an epistatic interaction of the two mutant alleles (43). The survival data clearly indicates that gene *PAK1* is necessary for complete WT-like DNA repair and that its epistatic interaction with a *pso2* $\Delta$  mutant allele suggests its role to be in the same repair pathway to which *PSO2* belongs, i.e. NER.

## Discussion

The *pso2* and *snm1* mutants were amongst the first yeast isolates found to be specifically sensitive to highly cytotoxic bi- or poly-functional mutagens (e.g. 8MOP+UVA, nitrogen mustard, trenimon) that, apart from mono-functional adducts, are able to produce bi-functional DNA lesions, amongst them the DNA-ICL (4, 5, 6, 44). Although being extensively studied (1, 2, 3) the role of the yeast gene *PSO2* as well as of other *PSO2*-like orthologues (25, 26, 27) in the removal of ICL in DNA is still not well understood. By identifying new phenotypes and using the THS we could isolate a set of putative interactors of Pso2p with a full DNA repair complementing bait (as shown in Figure 2) that allowed us to extend the genetic and molecular characterization of the *PSO2* gene involvement in repair of ICL-containing DNA.

The recently discovered sensitivity of *pso2* mutants to acetaldehyde (ACA), a naturally occurring metabolite of yeast sugar metabolism that is able to form ICLs (37, 38) and to break chromosomes (39), may indicate an important role of Pso2p in the normal life of yeast. In addition, any genetic constellation favoring the enhanced production of ACA, or prolonging its stability, might negatively influence growth kinetics and survival of a yeast culture. In this respect it is worth mentioning that the blocking of alcohol dehydrogenases, enzymes that are responsible to convert ACA to ethanol, by a drug called Disulfiram, will result in lower survival of a *pso2* mutant in absence of any external ICL-inducing chemical (M. Strauss, unpublished data).

With about 0.3 mRNA copies per cell, *PSO2* is poorly expressed (15) but it is specifically induced by a factor of about three by ICL-generating treatments (17). Here we show that ACA treatment also induces *PSO2* by about the same factor as proven by expression of  $\beta$ -galactosidase from a *PSO2* promoter-*lacZ* fusion construct (Figure 1B). Inducibility of *PSO2* (17) and some other genes which encode proteins functioning in DNA repair processes depends on an upstream sequence (Damage Responsive Element, DRE; 45) that is indirectly controlled by the *DUNI*-encoded nuclear protein kinase (Damage Uninducible; 18).

The existence of a gene that encodes a protein involved in the removal of ICL suggests natural conditions in which ICL lesions are generated in yeast DNA. ICL-generating treatments with nitrogen mustards, *cis*DDP or trenimon would not be encountered in the natural habitat of yeast. However, photoactivation of bifunctional psoralens could be a natural crosslinking procedure as well as crosslinking by UVC. The demonstrated sensitivity of *pso2* mutants to ACA would suggest ACA as a third candidate for natural generation of ICL in

yeast DNA. Although metabolic generation of ACA seems to be yeast strain specific with variations in free ACA from a few to 60mg/L (46), fluctuations of intracellular ACA pools that may reflect metabolic constraints could be the scenario of ICL formation in yeast.

The abortive repair of ICL in the yeast *pso2* mutant leads to DNA degradation, apparently via DNA double strand breaks [DSB] (5, 12, 47). These DSB must have another appearance that those introduced by ionizing radiation, as *pso2* is not sensitive to these radiation treatment (1, 4, 5). Bleomycin is used as an X-ray mimetic and is known to introduce DNA degradation via DSB through the production of free radicals (48). Since *pso2* mutants were also shown to be sensitive to bleomycin (Figure 2) we may deduce that bleomycin-induced DSB are also different from those produced by ionizing radiation. They may be the consequence of initiated repair events that fail to be successfully terminated (abortive repair) in mutants lacking the Pso2p. This means that DNA DSBs directly introduced by X-rays are not a substrate for Pso2p and that Pso2p may act on DSBs formed as intermediates produced by other repair proteins in ICL excision repair.

*PAK1*, *YHR080c* and *YJL084c* were the most interesting amongst the putative interactors found for Pso2p, and thus were further investigated. *PAK1* stands for a DNA Polymerase Alpha suppressing protein Kinase, that when over-expressed, was shown to act as a *RAD9*-dependent, allele-specific suppressor of thermo-labile DNA polymerase  $\alpha$  mutations, a feature which suggested a possibly involvement in DNA repair (40). *YHR080c* and *YJL084c*, are two ORFs of yet unknown function that were shown to be induced after DNA damage treatment with MMS (41). It is worth noting that not even a single gene known to be directly involved in DNA repair was found in two independent two-hybrid screenings (this work and M. Strauss, unpublished data). Perhaps our prey libraries were not representative or assembly of the protein complexes involving Pso2p relies on weak indirect interactions specific for the cell repair response state. On the other hand, it may be an indication of the complex dynamics of as yet unknown mechanisms and protein complexes acting in ICL repair.

*In silico* analysis of the isolated sub-fragment of the *PAK1* ORF did not reveal significant similarities to known proteins/domains deposited in the searched databases. Yjl084cp shares similarity with the hypothetical protein Ykr0201wp and was found to be a member of the Arrestin protein family (48) but the isolated ORF sub-fragment did not reveal motif similarity with any other protein. Yhr080cp shares similarities with the hypothetical proteins Ydr326cp, Yfl042cp and Ylr072wp and the isolated ORF sub-fragment contains the

recently defined GRAM motif (42). Members of this protein family were shown to play a role in environmental stress responses in higher plants (50), a fact that could be correlated with the observed induction factor of 6.2 after MMS treatment (41). Although being induced after MMS treatment (41), *YHR080c* $\Delta$  and *YJL084c* $\Delta$  mutant strains showed a WT-like DNA repair phenotype for the DNA damage chemicals tested (8-MOP+UVA, UVC, MMS, Trenimon, HN2; data not shown; M. Strauss, unpublished data). Interestingly putative *PSO2*-like DRE elements (17) were found within the 5' non-translated region of *YHR080c* and *YJL084c* as well as in *PAK1* and in the two ORFs of yet unknown function isolated in the two-hybrid screening (*YLR387c* and *YKR015c*; Figure 5). The putative regulatory elements are very similar to the DRE box found in the promoter region of *PSO2* and other repair genes (17). The aforementioned inducibility observed by Jelysky *et al.* (41) after MMS treatment for *YHR080c* and *YJL084c* could be associated with a damage response related to these putative regulatory elements. Whether these *PSO2*-like DRE elements are indeed responsible in inducing enhanced transcription in response to DNA damage will require further experiments.

The integrity of the conserved domain existing between Pso2p-related proteins of several species at the C-terminal third of the protein, recently baptized as  $\beta$ -CASP by Callebaut *et al.* (28), was clearly shown to be essential for WT-like DNA repair and necessary for interaction with Pak1p and *YHR080c* but not for interaction with *YJL084c* (Figure 2 and Table 2). The deletion of the last 195 amino acids in LexAPSO2-B bait includes the two conserved motifs B and C described by these authors and another conserved histidine motif identified in our study (Figure 3). While motifs A and B are conserved in all members of the  $\beta$ -CASP family, motif C distinguishes those members involved in RNA metabolism, where it is always a histidine, from proteins acting on DNA, where it is substituted by the hydrophobic amino acid valine

The recently identified Pso2p-like human Artemis protein is part of the DNA double strand break (DSB) repair machinery, as inferred from the phenotype of patients with severe immune deficiency combined with increased radio-sensitivity (RS-SCID) who possess defects in V(D)J recombination leading to arrest of B and T-cell maturation (27). With the potential enzymatic function of its metallo- $\beta$ -lactamase/ $\beta$ -CASP domain, Artemis has been shown to be involved in the opening of hairpin-sealed coding ends generated by the RAG1/RAG2 complex and nucleolytic activity on 5' and 3' overhangs (51). Moreover, Ma and coworkers (51) demonstrated that the Artemis hydrolase catalytic activity depends strictly on the continuous association of Artemis with the DNA dependent-protein kinase (DNA-PKcs). When

complexed to, and phosphorylated by, the DNA-PKcs, Artemis acquires enzymatic activities that are critical for the DNA-hairpin opening step of V(D)J recombination and for the 5' and 3' overhang processing in non-homologous DNA end joining. In view of this, the isolation of known protein kinases Pak1p and Nrk1p (40, 52) via THS (table 2) could be meaningful and would allow us to hypothesize that a similar association of Pso2p with Pak1p kinase could direct its possible enzymatic activity on a DNA post-incision substrate intermediate to help remove the cross-links. Whether the association of Pso2p with a protein kinase is necessary for complete WT DNA repair remains to be investigated.

The putative Pso2p interactors selected were tested for their sensitivity to DNA damaging agents and only the haploid *pak1Δ* strain was sensitive to UVC and 8-MOP+UVA when compared to the isogenic WT strain (Figure 4). This is in contrast to early observations reported by Ostroff and Sclafani (53) where strains harboring *pak1::LEU2* mutant alleles demonstrated no sensitivity to UVC at doses up to 70J/m<sup>2</sup>. The caffeine sensitivity for *pak1* mutant strains reported by two independent investigations (54, 40) could not be confirmed in repeated assays, neither by us nor by M. Strauss (unpublished data). The above-mentioned phenotypic differences could be due to different genetic backgrounds since clear phenotypic differences were often shown during gene function analysis among the yeast strains used (55).

Because the tested *pak1Δ* mutant displayed a DNA repair-deficiency phenotype, we checked for the genetic interaction between the *pak1Δ* and *pso2Δ* mutant alleles in double mutant strains that were otherwise isogenic with the corresponding single mutants, assaying for UVC and 8MOP+UVA sensitivity (Figure 4). According to the analysis of survival (43) the *pso2Δ* mutant allele showed epistatic interaction with *pak1Δ* since the double mutant displayed practically the same sensitivity as the single *pso2Δ* mutant strain. The survival data thus formally indicate that Pak1p and Pso2p might function in the same pathway to help repair damaged DNA. Moreover, based on our primary results, the yeast *PAK1* gene could be suggested as a new *locus* involved in DNA repair. Further experiments to better define the allocation of this gene within the three main epistasis groups (i.e., RAD3, RAD6 and RAD52; 56) are under way.

Investigation on repair of intermediate structures produced in ICL-containing DNA has been generating a number of publications reporting evidences involving nucleotide excision repair (NER) members as well as of the recombination, nonhomologous end-joining (NHEJ) and error-prone pathways in yeast (2, 8, 10, 12, 20, 21, 22, 57). Although some recent work suggested that NER might make only a partial contribution to ICL repair (21, 22),



other studies on the cross-link repair processes in yeast have shown that the NER members Rad1p, Rad2p and Rad3p are required for normal incision kinetics of ICLs (12, 20, 58) but not Pso2p (12, 20, 57), the error-prone Rev3p (2, 10) or the recombination Rad52p (2, 58). It is possible that the DSB is not a late result of processing DNA cross-links but is formed during replicating DNA that still contains (partially, or unilaterally) incised cross-links. This would indicate that ICL removal was not completed within 5 h, the time shown to be necessary for ICL removal in the WT-like *pso2-11<sup>ts</sup>* (*snm1-2<sup>ts</sup>*) mutants at the permissive temperature (7), but that DNA replication had already started again. Grossmann *et al.* (22) suggests that the *RAD51*, *REV3* and *PSO2* represent the three pathways (recombination, error-prone and NER, respectively) for the repair of ICLs, since a triple mutant displayed greater sensitivity than any of the double mutants and tolerated only one ICL per genome at LD<sub>37</sub>, indicating that three separate and distinct mechanisms are needed for optimal ICL repair. Paradoxically, if DSB repair is part of an ICL repair response, it is possible that, given a special DNA lesion, shared steps in recombination might be utilized by all three pathways. The given number of alternative mechanisms existing for homologous and non-homologous recombination (59) however, poses difficulties in presenting a model for ICL repair. Thus, the precise involvement of Pso2p with associated proteins able to regenerate high m.w. DNA after repair-induced DSBs clearly needs further investigation.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. R. Brent for kindly providing plasmids and strains. LFR and MS held fellowships of CNPq and of the Hessische Graduiertenfoerderung, respectively. Collaborative research was sponsored by DAAD-CAPES, DAAD-CNPq travel grants to LFR, HF and JAPH. This work was supported by CNPq, FAPERGS and GENOTOX (Laboratório de Genotoxicidade – Centro de Biotecnologia, UFRGS).

## REFERENCES

- [1] J.A.P. Henriques, M. Brendel, The role of *PSO* and *SNM* genes in dark repair of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.* 18 (1990) 387-393.
- [2] J.A.P. Henriques, J. Brozmanova, M. Brendel, 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 39 (1997) 185-196.

- [3] M. Brendel, J.A.P. Henriques. The *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism, *Mutat. Res.* 489 (2001) 79-96.
- [4] M. Brendel, A. Ruhland, Relationships between functionality and genetic toxicology of selected DNA-damaging agents, *Mutat. Res.* 133 (1984) 51-85.
- [5] J.A.P. Henriques, E. Moustacchi, Isolation and characterization of *pso* mutants sensitive to photoaddition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 95 (1980) 273-288.
- [6] A. Ruhland, M. Kircher, F. Wilborn, M. Brendel, A yeast mutant specifically sensitive to bifunctional alkylation, *Mutat. Res.* 91 (1981) 457-462.
- [7] W. Siede, M. Brendel, Isolation and characterization of yeast mutants with thermoconditional sensitivity to the bifunctional alkylating agent nitrogen mustard, *Curr. Genet.* 4 (1981) 145-149.
- [8] J.A.P. Henriques, E. Moustacchi. Interaction between mutations for sensitivity to psoralen photoaddition (*pso*) and to radiation (*rad*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 148 (1981) 248-256.
- [9] E. Moustacchi, C. Cassier, R. Chanet, N. Magaña-Schwencke, T. Saeki, J.A.P. Henriques, Biological role of photo-induced crosslinks and monoadducts in yeast DNA: genetic control and steps involved in their repair, in: E.C. Friedberg, B.A. Bridges (Eds.), *Cellular Responses to DNA Damage*, Liss, New York, 1983, pp. 87-106.
- [10] K.F. Grossmann, A.M. Ward, R.E. Moses, *Saccharomyces cerevisiae* lacking *Snm1*, *Rev3* or *Rad51* have a normal S-phase but arrest permanently in G2 after cisplatin treatment, *Mutat. Res.* 461 (2000) 1-13.
- [11] C. Cassier-Chauvat, E. Moustacchi, Allelism between *pso1-1* and *rev3-1* mutants and between *pso2-1* and *snm1* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.* 13 (1988) 37-40.
- [12] N. Magaña-Schwencke, J.A.P. Henriques, R. Chanet, E. Moustacchi, The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced cross-links in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair deficient strains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 1722-1726.
- [13] M. Kircher, M. Brendel, DNA alkylation by mustard gas in yeast strains of different repair capacity, *Chem.-Biol. Interactions* 44 (1983) 27-39.
- [14] E. Haase, D. Riehl, M. Mack, M. Brendel, Molecular cloning of *SNM1*, a yeast gene responsible for a specific step in the repair of cross-linked DNA, *Mol. Gen. Genet.* 218 (1989) 64-71.
- [15] D. Richter, E. Niegemann, M. Brendel, Molecular structure of the DNA cross-link repair gene *SNM1(PSO2)* of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Gen. Genet.* 231 (1992) 194-200.
- [16] E. Niegemann, M. Brendel, A single amino acid change in *SNM1*-encoded protein leads to thermoconditional deficiency for DNA cross-link repair in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutat. Res.* 315 (1994) 275-279.
- [17] R. Wolter, W. Siede, M. Brendel, Regulation of *SNM1*, an inducible *Saccharomyces cerevisiae* gene required for repair of DNA cross-links, *Mol. Gen. Genet.* 250 (1996) 162-168.
- [18] Z. Zhou, S.J. Elledge, *DUN1* encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast, *Cell* 75 (1993) 1119-1127.
- [19] Gazis et al., unpublished
- [20] F. Wilborn, M. Brendel, 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. Genet.* 16 (1989) 331-338.

- [21] P.J. McHugh, W.R. Sones, J.A. Hartley, Repair of intermediate structures produced at DNA interstrand cross-links in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell Biol.* 20 (2000) 3425-3433.
- [22] K.F. Grossmann, A.M. Ward, M.E. Matkovic, A.E. Folias, R.E. Moses, *S. cerevisiae* has three pathways for DNA interstrand crosslink repair. *Mutat. Res.* 487 (2001) 73-83.
- [23] J.A. Eisen, P.C. Hanawalt, A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes, *Mutat. Res.* 435 (1999) 171-213.
- [24] I. Demuth, M. Digweed, Genomic organization of a potential human DNA-crosslink repair gene, *KIAA0086*, *Mutat. Res.* 409 (1998) 11-16.
- [25] M.L. Dronkert, J. de Wit, M. Boeve, M.L. Vasconcelos, H. van Steeg, T.L. Tan, J.H. Hoeijmakers, R. Kanaar, Disruption of mouse SNM1 causes increased sensitivity to the interstrand cross-linking agent mitomycin C, *Mol. Cell Biol.* 20 (2000) 4553-4561.
- [26] S.V. Tavtigian, J. Simard, D.H. Teng, V. Abtin et al., A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p, *Nat. Genet.* 27 (2001) 172-180.
- [27] D. Moshous, I. Callebaut, R. de Chasseval, B. Corneo, M. Cavazzana-Calvo, F. Le Deist, I. Tezcan, O. Sanal, Y. Bertrand, N. Philippe, A. Fisher, J.P. de Villartay, Artemis, a novel DNA double-strand break repair/ V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency, *Cell* 105 (2001) 177-186.
- [28] I. Callebaut, D. Moshous, J.P. Mornon, J.P. de Villartay, Metallo- $\beta$ -lactamase fold within nucleic acids processing enzymes: the  $\beta$ -CASP family, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 3592-3601.
- [29] M.D. Rose, F. Winston, P. Hieter, *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. (1990)
- [30] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. (1989)
- [31] F. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. More, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, *Current Protocols in Molecular Biology*, 3<sup>rd</sup> ed. (Suppl. 33), Wiley, USA. (1996).
- [32] J. Gyuris, E. Golemis, H. Chertkov, R. Brent, Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75 (1993) 791-803.
- [33] R.J. Rothstein, One-step gene disruption in yeast, *Meth. Enzymol.* 101 (1983) 202-210.
- [34] P.M. Watt, E.J. Louis, R.H. Borts, I.D. Hickson, Sgs1: a eukaryotic homolog of *E. coli* RecQ that interacts with topoisomerase II *in vivo* and is required for faithful chromosome segregation. *Cell* 81 (1995) 253-260.
- [35] H.W. Mewes, D. Frishman, C. Gruber, B. Geier, D. Haase, A. Kaps, K. Lemcke, G. Mannhaupt, F. Pfeiffer, C. Schuller, S. Stocker, B. Weil, MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 37-40.
- [36] A.F. Maris, D. Bonatto, M. Brendel, J.A.P. Henriques, Diauxic shift-induced stress resistance against hydro-peroxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria, *Curr. Genet.* 39 (2001)137-149.
- [37] T. Matsuda, M. Kawanishi, T. Yagi, S. Matsui, H. Takebe, Specific tandem GG to TT base substitutions induced by acetaldehyde are due to intra-strand crosslinks between adjacent bases, *Nucleic Acids Res.* 26 (1998) 1769-1774.
- [38] H.J. Ristow, G. Obe, Acetaldehyde induces cross-links in DNA and causes sister-chromatid-exchanges in human cells, *Mutat. Res.* 58 (1978) 115-119.
- [39] H.J. Ristow, A. Seyfarth, E.R. Lochmann, Chromosomal damages by ethanol and acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae* as studied by pulsed field gel electrophoresis, *Mutat. Res.* 326 (1994) 165-170.
- [40] P.G. Hovland, M. Tecklenberg, R.A. Sclafani, Overexpression of the protein kinase suppresses yeast DNA polymerase mutations, *Mol. Gen. Genet.* 256 (1997) 45-53.

- [41] S. Jelynsky, L. Samson, Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96 (1999) 1486-1491.
- [42] T. Doerks, M. Strauss, M. Brendel, P. Bork, GRAM, a novel domain in glucosyltransferases, myotubularins and other putative membrane-associated proteins, TIBS 25 (2000) 483-485
- [43] M. Brendel, R.H. Haynes, Interactions among genes controlling sensitivity to radiation and alkylation in yeast, Mol. Gen. Genet. 125 (1973) 197-216.
- [44] C. Cassier, E. Moustacchi, Mutagenesis induced by monofunctional and bi-functional alkylating agents in yeast mutants sensitive to phot-addition of furocumarins (pso), Mutat. Res. 84 (1981) 37-47.
- [45] W. Siede, E.C. Friedberg, Regulation of the yeast *RAD2* gene: DNA damage-dependent induction correlates with protein binding to regulatory sequences and their deletion influences survival, Mol. Gen. Genet. 232 (1992) 247-256.
- [46] P. Romano, G. Suzzi, L. Turbanti, M. Polsinelli, Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts, FEMS Microbiol Lett. 118(1994) 213-218.
- [47] N. Magaña-Schwencke, D. Aeverbeck, Repair of exogenous (plasmid) DNA damaged by photoaddition of 8-methoxypsoralen in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Mutat. Res. 251 (1991) 123-131.
- [48] M.J. Absalon, J.W. Kozarich, J. Stubbe, Sequence-specific double-strand cleavage of DNA by Fe-bleomycin. 1. The detection of sequence-specific double strand breaks using hairpin oligonucleotides. Biochemistry 34 (1995) 2065-2075.
- [49] K. Palczewski, Structure and functions of arrestins, Protein Sci 3 (1994) 1355-1361.
- [50] P.J. O'Mahony, M.J. Oliver, Characterization of a desiccation-responsive small GTP-binding protein (Rab2) from the desiccation-tolerant grass *Sporobolus stapfianus*, Plant Mol. Biol. 39 (1999) 809-821.
- [51] Y. Ma, U. Pannicke, K. Schwarz, M.R. Lieber, Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination, Cell 108 (2002) 781-794.
- [52] M. Lussier, A.M. White, J. Sheraton, T. di Paolo, J. Treadwell, S.B. Southard, C.I. Horenstein, J. Chen-Weiner, A.F. Ram, J.C. Kapteyn, T.W. Roemer, D.H. Vo, D.C. Bondoc, J. Hall, W.W. Zhong, A.M. Sdicu, J. Davies, F.M. Klis, P.W. Robbins, H. Bussey, Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*, Genetics 147 (1997) 435-450.
- [53] R.M. Ostroff, R.A. Sclafani, Cell cycle regulation of induced mutagenesis in yeast. Mutat Res. 329 (1995) 143-152.
- [54] V. Smith, K.N. Chou, D. Lashkari, D. Botstein, P.O. Brown, Functional analysis of genes of yeast chromosome V by genetic fingerprinting, Science 274 (1994) 2069-2074.
- [55] A. Rogowska-Wrzesinska, P.M. Larsen, A. Blomberg, A. Görg, P. Roepstorff, J. Norbeck, S.J. Fey, Comparison of the proteomes of three yeast wild type strains: CEN.PK@, FY1679 and W303, Comp. Funct. Genom. 2 (2001) 207-225.
- [56] J.C. Game, The *Saccharomyces cerevisiae* repair genes at the end of the century, Mutat. Res. 451 (2000) 277-293.
- [57] M.L.G. Dronkert, R. Kanaar, Repair of DNA interstrand cross-links, Mutat. Res. 486 (2001) 217-247.
- [58] V. Meniel, N. Magaña-Schwencke, D. Aeverbeck, Preferential repair in *Saccharomyces cerevisiae rad* mutants after induction of interstrand cross-links by 8-methoxypsoralen plus UVA, Mutagenesis 10 (1995) 543-548.
- [59] F. Pâques, J.E. Haber, Multiple pathways of recombination induced by double strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*, Microb. Mol. Biol. Rev. 63 (1999) 349-404.

Table 1. List of *S. cerevisiae* strains used in this study

Strain	Relevant genotype	Source
BY4742 (WT)	<i>Mat<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	EUROSCARF
Y11339	<i>Mat<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 yjl084c::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y11908	<i>Mat<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 yhr080c::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y16128 ( <i>pak1<math>\Delta</math></i> )	<i>Mat<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 yer129w::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY <i>pso2<math>\Delta</math></i>	<i>Mat<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <i>pso2</i>::URA3</i>	this work
BY <i>pso2<math>\Delta</math>/pak1<math>\Delta</math></i>	<i>Mat<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 yer129w::kanMX4 <i>pso2</i>::URA3</i>	this work
EH3714-2B	<i>Mata ade2-1 lys1-1 his5-2 ura3-52 leu2-3, 112</i>	16
EH3846-4A	<i>Mata ade2-1 lys1-1 his3 ura3-52 leu2-3, 112 trp1 <i>pso2-11</i></i>	16
EGY48	<i>Mata ura3 his3 trp1 LexAOp(6)::LEU2</i>	R. Brent <sup>b</sup>

Table 2. Genes isolated in a two-hybrid screen using LexAPSO2-A as bait

Gene	Gene information <sup>b</sup>	Extent of fusion <sup>d</sup>
<i>NRK1/KIC1</i> (22) <sup>a</sup>	Ser/Thr protein kinase that interacts with Cdc31p; required for cell integrity and morphogenesis; involved in cell wall biogenesis; 3.8 fold induction after MMS treatment	Amino acids 832-1432
<i>PAK1</i> (6)	DNA synthesis; protein kinase capable of suppressing DNA polymerase alpha mutations ( <i>cdc17-1</i> ); RAD9 gene product is required for the suppression; C75 <sup>c</sup>	C-terminal third of the protein
<i>YLR387c</i> (4)	Unknown function; possibly involved in proteasome function; similarity to YBR267w; 7.5 fold induction after MMS treatment	Amino acids 60-327
<i>YKR015c</i> (4)	Unknown function	C-terminal third of the protein
<i>APL6</i> (3)	AP-3 complex subunit; probably involved in vesicle transport from the plasma membrane	C-terminal 90 amino acids
<i>FIR1</i> (1)	3' RNA processing/modification; interacts with REF2	Strats at amino acid 251
<i>IFH1</i> (1)	Protein controlling rRNA expression	C-terminal half of the protein
<i>YHR080c</i> (1)	Unknown; 6.2-fold induction after MMS treatment	Amino acids 340-713
<i>YJL084c</i> (1)	Unknown; 1.7-fold induction after MMS treatment	C-terminal half of the protein

<sup>a</sup> Frequency of independent isolation is shown in parentheses

<sup>b</sup> According to ref. 35, SGD (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>), and the Yeast protein complex database (<http://yeast.cellzome.com/>).

<sup>c</sup> C indicates association indicates association of the respective isolate with the protein complex from the Yeast protein complex database (<http://yeast.cellzome.com/>).

<sup>d</sup> Segment of each ORF fused to the transcriptional activation domain constructs

**Table 3.** Comparison of  $\beta$ -Galactosidase activity between Pso2p potential interactors isolated in the THS<sup>a</sup> with either LexAPSO2-A or the LexAPSO2-B baits

DNA binding domain plasmid (pEG202)	Activation domain plasmid (pJG4-5)	Galactose	
		Leu	$\beta$ -Galactosidase activity <sup>b</sup>
pLexA GAL4	pJG4-5 (HA-tagged)	++	697±54.4
pLexA Bicoid	pJG4-5 (HA-tagged)	-	6.5±2.0
LexAPSO2-A	pJG4-5-YJL084c (aa 530-1046)	++	BLUE
LexAPSO2-A	pJG4-5-PAK1 (aa 618-1142 )	++	82.82±17.6
LexAPSO2-A	pJG4-5-YHR080c (aa 340-713)	++	33.9±13.4
LexAPSO2-B	pJG4-5-YJL084c (aa 530-1046)	++	BLUE
LexAPSO2-B	pJG4-5-PAK1 (aa 618-1142)	-	3.5±2.3
LexAPSO2-B	pJG4-5-YHR080c (aa 340-713)	-	2.8±0.3

<sup>a</sup> Plasmids that directed the synthesis of the DNA-binding domain (pEG202) and activation domain (pJG4-5) fusion proteins were introduced into EGY48. In addition to the LexAop(6)-*LEU2*, the strain also harbored pSH18-34, a very sensitive LexAop-*lacZ* reporter. All constructions expressed full length fusion proteins except when indicated. pLexA GAL4 is a transcription activator and was used as positive control; pLexA Bicoid contains residues 2-160 of the *Drosophila* bicoid gene product and was used as negative control.

<sup>b</sup> Expressed in Miller Units. The values are averages from three to four independent transformants each assayed in duplicate. BLUE indicates strong coloring in solid galactose Synco media of the above mentioned putative interactor.

Figure 1

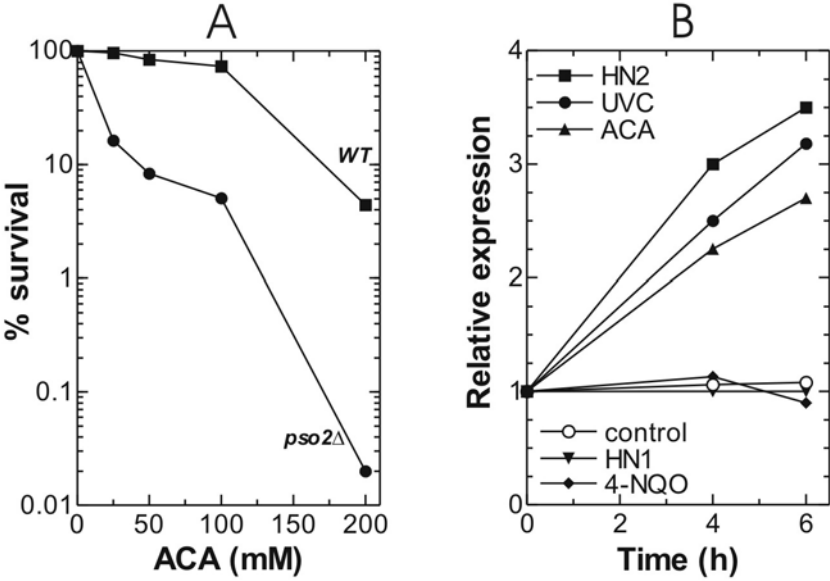


Figure 2

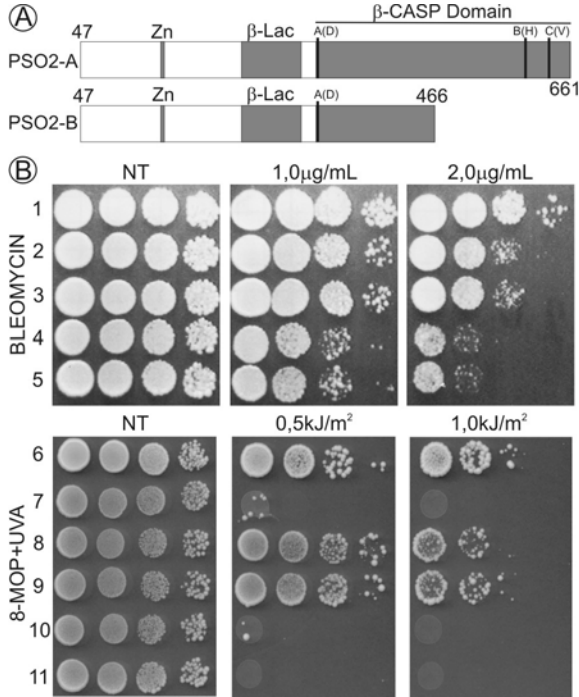




Figure 3

A

```

PSO2Sc      367 NETLDQVYLDITTYMTM-GANFPSQHSVCETVADFTLRLIKHGKNTFGDSQRNLFHFQQRKTLTTHRYRVLFLVCTYTIC
YDH2Sp      296 EKTTHKVVYLDITTYLNP-KMTEFPPQADVQACADKAI SIKKSTDS-----RLLVVVSTYSIG
KIAA0086Hs  829 DQKVHMLYLDITTYCSP-EYTFPSQQEVIRFAINTAFEAVTLNPH-----ALVVCCTYSIG
SNM1Mm      812 GRKVHTLFLDITTYCSP-EYTFPSQQEVIQFAINTAFEAVTLNPR-----ALVVCCTYCIG
orf12At     275 NQRVHVLVYLDITTYCNP-RMKFPSKEDVLSYVVRITKDFLRKQPK-----TLIVVCSYSIG
CG10018Dm  394 HSNIDLLYLDITTYMNK-NMDFCHQSESVDRAVDLVRAFLEKNAKR-----ILIVCSYSVIG
FLJ12810Hs 136 GKQHTLYLDITTYNCNP-ALVLP SRQEAAHQIVQLIRKHPQHNIK-----ICLYSLG
ArtemisHs  156 VKDTHQSVYLDITTFCDPRFYQIPSRREECLSGVLELVRSWITRSPYH-----VWVWLNCKAAYG

```

-----EEEEEEEE-----

```

PSO2Sc      KEKLAIKICEFETKTKLFVMPNSVKFSMMLTVLQNNENQNDMWDDESLLTSNLHESVHLVPIRVLKSQETIEAYLKSDEKEL
YDH2Sp      KEKVAVAIAKSISSRRIYVVR-----KMHI IKQLENQD---LIDLLTDDPTQASVHMVTMMGIHPN-----SLLDY
KIAA0086Hs  KEKVFLAIADVIGSKVGMSEQE-----KYKTLQCLNIPEIN---SLITDMCSSLVHLLPMMQINFKG-----LQSH
SNM1Mm      KEKVFLAIADVIGSKVGMSEQE-----KYKTLQCLNIPEVS---SLITDMCDSLHLLPMMQINFKG-----LQSH
orf12At     KEKVFLAIADVIGSKVGMSEQE-----KYKTLQCLNIPEVS---SLITDMCDSLHLLPMMQINFKG-----LQSH
CG10018Dm  KEKVLWALAKEFTMRVWTESN-----RSTAVRCLNWPDL---SVLTEDRSGANLHVLIAMGKISYPS-----LVDY
FLJ12810Hs  KESLLEQLALEFQTWVLSR-----RLELQQLGLAD-----VFTVEEKAGRIHADVHMEICHSN-----LQSH
ArtemisHs  YEYLFNLSSEEGVQVHVNKL-----DMFR---NMPEILHHLTDRNTQIHACRHPKAEYFQWSK-----LPCG

```

-----

```

PSO2Sc      ETDYVKDIEDVVGFIPTGWSHNFGKLYQKKNDDDENEMSGNTEYCLELMKNDRDNDENGFEISSILRQYKKNKQVFN
YDH2Sp      LEQYNSSFDKIIGYKVTGWTFFQPLENRAQLSSSLDSIISRPPKFVEYDLRAIRGSTD-----KVAAFV
KIAA0086Hs  LKKCGGKYNQILAFRPTGWTHS-----NKFTRIADVI-PQTKG-----NISIYG
SNM1Mm      LKKCGGKYDQILAFRPTGWTHS-----NNITSTADII-PQTRG-----NISIYG
orf12At     LKIYREQYGAVALAFRPTGWTHS-----EKIGEHLDLIKPTSRG-----KITIYG
CG10018Dm  FTEFEDQYDMLLGIRPSGWEKN-----SKPSYG-----KRISTIG
FLJ12810Hs  MLRWNTHTPTAILPTSRKIHS-----SHPDIHV
ArtemisHs  ITRNRRIPLHII SIKPSTMWFG-----ERSRKTNVIVR-----TGESSYR

```

-----B-----C-----

```

PSO2Sc      VPYSEHSSFNDELVKEGCKLKCSEVIPTVNLN 636
YDH2Sp      APYSEHSSFYDLTMEFLSNIGHIIPTVNVG 507
KIAA0086Hs  IPYSEHSSYLEMKREVFQWLPKPKIIPTVNVG 1029
SNM1Mm      IPYSEHSSYLEMKREVFQWLPKPKIIPTVNVG 1002
orf12At     VPYSEHSSFTELRERVFQFLRPDKIIPTVNNG 466
CG10018Dm  IEYSEHSSYKELERERVFQFLRPDKIIPTVNVG 578
FLJ12810Hs  IPYSDHSSYSEIRAFVAAIKPKCQVVEIVSRR 301
ArtemisHs  ACESEHSSYSEIKDELSYLCFVNAYENVIPV 344

```

Figure 4

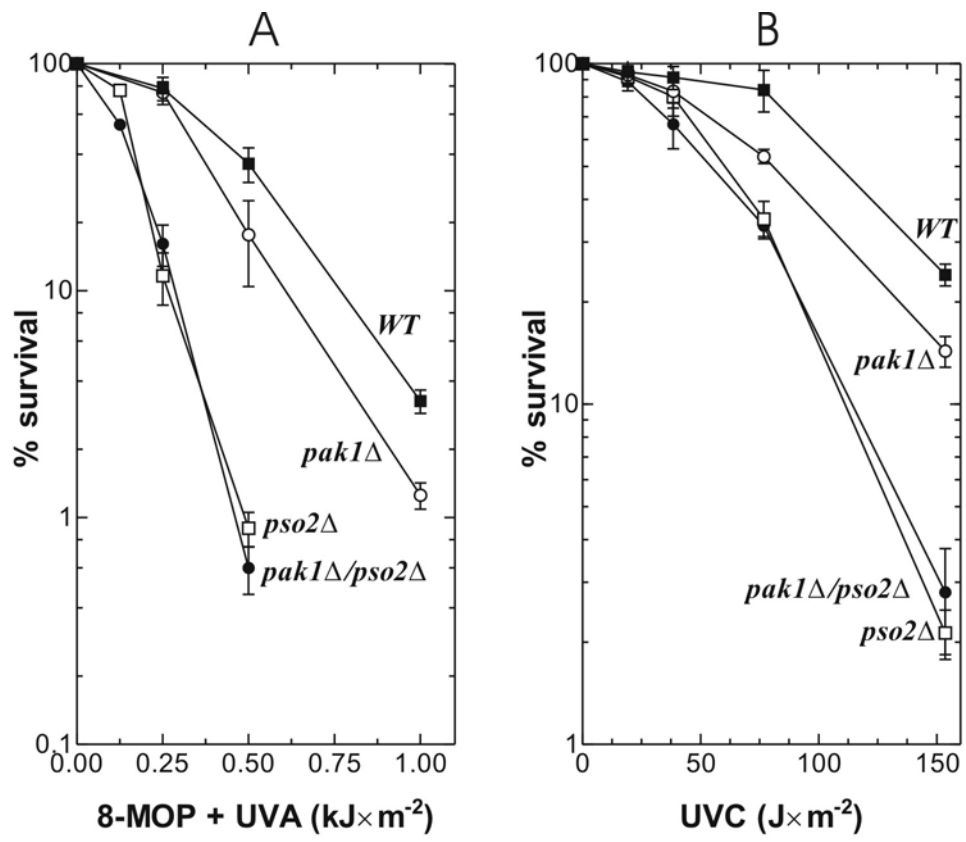


Figure 5

```
RAD2-1 -168: GTGGAGGCATTAAAA
PHR1 -102: GAGGAAGCAGTCAAA
RNR3 -127: ATAAAGGCACTGCTA
RAD2-2 -93: TTAAAGGGATTGAAA
RAD18 -107: CAATAGAAAAGTGAAA
RAD23 -296: GTGGCGAAATTGAAA
RAD7 -122: ATGGAAGCAAAAATG

PSO2 -117: GGAAACGGACTGAAA
PAK1 -429: GGAAAGGGAGTCAAT
YKR015c -440: GTAAACGGAATCAATA
YLR387c -123: CGAAAGAGAATAAAA
YJL084c -118: TGAGAGAGACTAAAA
YHR080c -198: AGAATTGGCGCAAAA
consensus : GTAAAGGGACTGAAA
```

## Figure legends

**Figure 1.** ACA cytotoxicity and  $\beta$ -galactosidase expression in response to various mutagens. (A) cytotoxicity of exogenous acetaldehyde in haploid yeast cells; squares, BY4742 (WT); circles, BY*pso2* $\Delta$ . (B) expression of  $\beta$ -galactosidase in response to various mutagens in haploid yeast strain EH3714-2B containing a *PSO2-lacZ* fusion. Relative expression: relative increase of  $\beta$ -galactosidase in mutagen treated vs. untreated cultures. HN2 (1 $\mu$ M), UVC (UV<sub>254</sub> 70J/m<sup>2</sup>), ACA (18mM), HN1 (100 $\mu$ M), 4-NQO (1 $\mu$ g/mL) and control (non treated culture). The presented data are averages of two independent assays.

**Figure2.** LexAPSO2 bait constructs and complementation assays after mutagen treatment. (A) drawing showing the length in amino acids of the LexAPSO2-A (PSO2-A) and LexAPSO2-B (PSO2-B) bait constructs and the position of predicted conserved domains: putative zinc finger domain (Zn);  $\beta$ -lactamase ( $\beta$ -lac); and the  $\beta$ -CASP region with the three conserved motifs represented for  $\beta$ -CASP proteins acting on DNA substrates [A (aspartic acid), B (histidine) and C (valine)]. (B) Bleomycin treatment: EH3714-2B strain containing the pEG202 empty plasmid (1), EH3846-4A strain containing the LexAPSO2-A bait construction (2, 3), EH3846-4A strain containing the LexAPSO2-B bait construction (4), EH3846-4A strain containing the pEG202 empty plasmid (5); 8-MOP + UVA treatment: BY4742 (WT) strain containing the pEG202 empty plasmid (6), BY*pso2* $\Delta$  strain containing the pEG202 empty plasmid (7), BY*pso2* $\Delta$  strain containing the LexAPSO2-A bait construction (8, 9), BY*pso2* $\Delta$  strain containing the LexAPSO2-B bait construction (10, 11).

**Figure 3.** Amino acid alignment of Pso2p C-terminal half of the protein containing the  $\beta$ -CASP domain and other potential orthologs from various organisms. The conserved motifs A, B and C among the members of the  $\beta$ -CASP family are indicated. Identical residues are shown in black and conserved residues in dark and light gray. The dotted line denotes the last 195 amino acids, which were deleted in LexAPSO2-B bait. The line indicates the newly identified region of similarity containing a conserved polar amino acid histidine in a predicted extended strand region (E) within aa sequence 491-509. The accession numbers at the NCBI are: PSO2Sc (*S. cerevisiae* P30620) YDH2Sp (*Schizosaccharomyces pombe* 19862928), KIAA0086Hs (*Homo sapiens* 577303), SNM1Mm (*Mus musculus* 9055350), orf12At (*Arabidopsis thaliana* 1495267), CG10018Dm (*Drosophila melanogaster* 7296732) FLJ12819Hs (*H. sapiens* 12383082), ArtemisHs (*H. sapiens* 13872809).

**Figure 4.** Survival of haploid WT (BY4742), *pak1* $\Delta$  (Y16128), *pso2* $\Delta$  (BY*pso2* $\Delta$ ) and *pso2* $\Delta$ /*pak1* $\Delta$  (BY*pso2* $\Delta$ /*pak1* $\Delta$ ) mutants after UVC and 8-MOP+UVA treatment. (A) show survival of *pso2* $\Delta$  in combination with *pak1* $\Delta$  for UVC. (B) show survival of *pso2* $\Delta$  in combination with *pak1* $\Delta$  for 8-MOP+UVA.

**Figure 5.** Comparison of the DRE-like sequences of repair genes with putative interactors of Pso2p. Upper panel: comparison of DRE-like sequences of inducible *S. cerevisiae* genes involved in DNA repair. Lower panel: comparison of *PSO2* DRE-like sequence promoter with 5' untranslated regions of some of its isolated putative binding partners.

## **CAPÍTULO IV**

### **DISCUSSÃO**

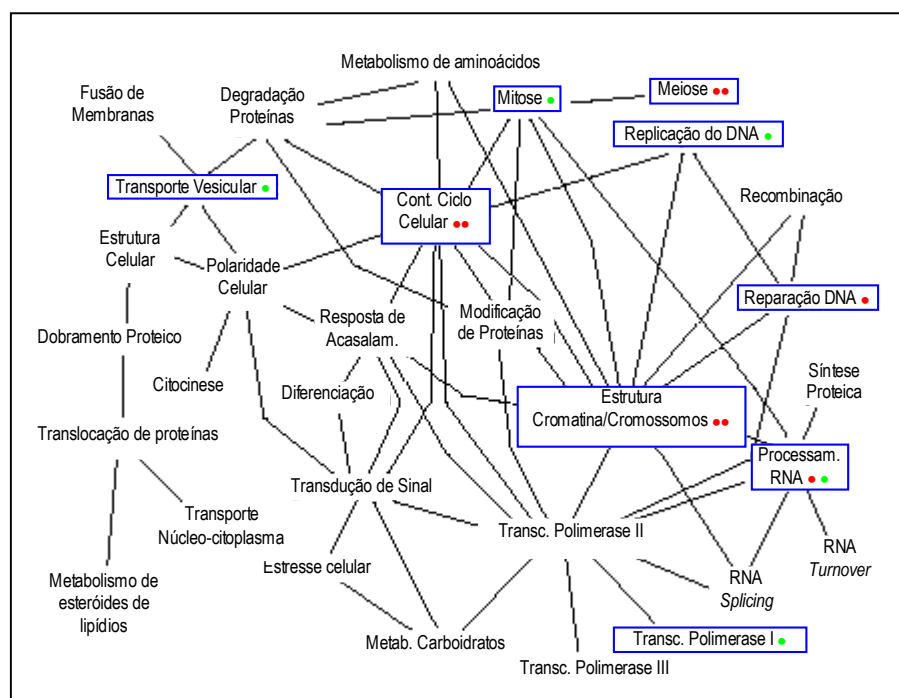
## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. As interações proteína-proteína obtidas com Pso2p e Pso4p

Com o intuito de isolar proteínas capazes de interagir com Pso2p e Pso4p utilizando o sistema duplo-híbrido, construções funcionais dos genes correspondentes (capazes de complementar os fenótipos de mutantes *pso2* e *pso4-1*) foram empregadas para gerar uma coleção de candidatos potencialmente capazes de serem interatores destas duas proteínas (capítulo 2 e 3). A localização dos interatores potenciais de Pso2p e Pso4p com função conhecida no mapa de interação funcional gerado por Schwikovsky *et al.* (2000) confirma que estes produtos gênicos isolados neste trabalho pertencem a classes funcionais relacionadas com reparação do DNA e manutenção da estrutura cromossômica e da cromatina em *S. cerevisiae* (Figura 7).

A utilização de iscas (*baits*) mutantes tanto no estudo do gene *PSO4* quanto no *PSO2* mostrou que a alteração de um simples aminoácido (*pso4-1*; Capítulo 2) ou da deleção de parte de um domínio importante (iscas do gene *PSO2* contendo deleções; Capítulo 3) foi capaz de alterar as propriedades de interação das respectivas construções com parte de seu interatores potenciais. Esta mesma metodologia foi amplamente utilizada para estudo da dinâmica da montagem do complexo funcional PRP19-AC (ver Capítulo 2 para descrição do complexo) durante o processamento de pre-mRNA por dois diferentes grupos de pesquisa (Tsai *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001, 2002; Ohi e Gould, 2002) o que reforça a hipótese de que as interações observadas entre Pso4p e seu possíveis interatores são biologicamente relevantes. Paradoxalmente, a aplicação do sistema dois-híbridos de forma sistemática para identificar componentes protéicos envolvidos no processamento de mRNA, incluindo membros do complexo PRP19-AC como iscas nunca detectou integrantes do mesmo complexo (S-C. Cheng, comunicação pessoal). Este fato foi também confirmado neste estudo. Como a construção utilizando Pso4p como isca demonstrou ser perfeitamente funcional (ver anexo 2), isto é, capaz de complementar fenótipos quando introduzida na linhagem mutante *pso4-1*, estas observações podem indicar falta de representatividade nas bibliotecas de presas (*prey library*) utilizadas, ou de que as interações observadas sejam mediadas por componentes do próprio complexo atuando como pontes. Neste caso é possível que alguns dos genes isolados pelo sistema dois-

híbridos possam constituir interatores do complexo PRP19-AC e não de Pso4p/Prp19p exclusivamente.



**Figura 7.** Rede de grupos funcionais proposta para *S. cerevisiae*. Em azul são mostradas as classes funcionais onde se classificam as proteínas codificadas pelos genes identificados como interatores Pso2 e Pso4p com função conhecida. Genes identificados como interatores do Pso4p estão identificados em vermelho e do gene Pso2p em verde. Modificado de Tucker *et al.*, 2001

Em vista de estudos anteriores, analisando em escala genômica, as interações proteicas codificadas pelos mais de 6.000 genes de *S. cerevisiae* não terem revelado uma posição funcional para Pso2p dentro dos mapas de interações gerados (Ito *et al.*, 1999; Schwikovsky, *et al.*, 2000; Uetz *et al.*, 2000, Ito *et al.*, 2001; Gavin *et al.*, 2002), os resultados relatados neste trabalho, representam a primeira iniciativa de identificar possíveis interatores da proteína codificada por este gene, utilizando o sistema dois-híbridos, com o intuito de melhor definir o seu papel no ainda complexo processo de reparação de pontes intercadeia em *S. cerevisiae*. A identificação de Pak1p como interator de Pso2p aliado ao fato de que mutantes *pak1Δ* são sensíveis a tratamentos com UVC e 8-MOP+UVA são bons indicadores de que este gene representa um novo locus importante para a reparação do DNA em *S. cerevisiae* e sustenta a hipótese de que sua interação com Pso2p é biologicamente relevante. Além disso, a demonstração pelo ensaio do sistema

dois-híbridos de que a integridade do domínio  $\beta$ -CASP (Callebaut *et al.*, 2002) é necessária não somente para a reparação proficiente do DNA, mas também para manter a interação de Pso2p com Pak1p e Yhr080cp, reforça esta hipótese (Capítulo 3).

#### **4.2. O fenótipo pleiotrópico do mutante *pso4-1* e sua influência na reparação do DNA e processamento de pre-mRNA**

A natureza particular do alelo mutante *pso4-1* do gene *PSO4/PRP19* permitiu investigar e explicar uma quantidade significativa de fenômenos biológicos associados ao seu fenótipo pleiotrópico através de tratamentos com diferentes temperaturas, um procedimento reconhecidamente legítimo em genética de microrganismos. Estas observações foram complementadas bioquímica e molecularmente provando-se que o processamento de pre-mRNA no mutante *pso4-1* é dependente da temperatura (Capítulo 2). O teste principal para avaliar quantitativamente o efeito da mutação *pso4-1* na eficiência do processamento de mRNA foi o sistema repórter baseado no plasmídio pSB18 contendo a fusão *ACT1-lacZ* (Capítulo 2). Este sistema é bastante sensível e conhecido por prover dados relativamente lineares de eficiência de processamento de pre-mRNA (Larson *et al.*, 1983; Lesser e Guthrie, 1993). A técnica de RT-PCR, já utilizada previamente para medir eficiência de *splicing* (Davis *et al.*, 2000) e validar dados de microarranjos em escala genômica (Clarck *et al.*, 2002), assim como os ensaios de sensibilidade termocondicional e outro sistema reporter (*ACT1-CUPI*, Lesser e Guthrie, 1993) foram usadas para complementar e confirmar os dados obtidos com o sistema repórter *ACT1-lacZ*. O padrão de amplificação do gene *ECM33* depois da reação de RT-PCR, embora não permita quantificação precisa, demonstrou claramente diferentes graus de acúmulo de pre-mRNA não processado nas condições de temperatura testadas (capítulo 2 Figura 2).

Os resultados obtidos após os ensaios de sensibilidade termocondicional, interação proteína-proteína e interação genética após tratamento com UVC e 8-MOP+UVA são consistentes com a função previamente estabelecida para Pso4p/Prp19p como uma proteína associada ao spliceossoma durante o processamento de pre-mRNA (Cheng *et al.*, 1993). Considerando a reparação do DNA como resultado da ação em concerto pelo menos 88 loci (Game *et al.*, 2000; Mewes *et al.*, 2000), o processamento ineficiente de pre-mRNAs de genes contendo introns, especialmente os envolvidos em recombinação (*MEI4*, e os do



tipo *recA* *MER2/REC107*, *REC114*, e *DMC1*), reparação do DNA (*MMS2*, *RFA2*, *RAD14* e *KIN28*), e ciclo celular/estrutura cromossômica/segregação (*UBC9*, *GLC7*, *HOP2*, *CIN2*, *MOB1*) (Mewes *et al.*, 2000; Constanzo *et al.*, 2001) podem levar aos fenótipos observados. Como a via NER é responsável por grande parte da reparação induzida por radiação UVC, impedindo as suas funções através do bloqueio da expressão correta dos genes *RFA2*, *RAD14* e *KIN28* pode ser a principal causa da sensibilidade à radiação UVC observada.

A expressão termocondicional de genes em construções sem introns substituindo genes interrompidos no mutante *pso4-1* poderia resultar na restauração de alguns fenótipos associados a estes genes, porém uma resposta simples não é esperada, em virtude da atuação em segundo plano de outros genes interrompidos, capazes de influenciar a resposta da sensibilidade à radiação UVC, não permitindo uma resposta proficiente na reparação do DNA como na linhagem tipo selvagem. A mutação *pso4-1* influencia naturalmente tantas funções celulares que impossibilita acessar todo o seu impacto no metabolismo das células de levedura. A sua influência apenas na sensibilidade à radiação UVC influencia pelo menos 7 loci conhecidos, além de outros ainda de função desconhecida que podem interferir na resposta fenotípica. Em virtude do exposto, o fenótipo pleiotrópico da mutação *pso4-1* poderia ser considerado como o melhor exemplo da contribuição quantitativa de todos os genes interrompidos para as diferentes funções celulares na levedura *S. cerevisiae*.

### **4.3. Dinâmica da interface matriz nuclear-cromatina e reparação do DNA**

A caracterização recente do ortólogo humano hNMP200 do gene *PSO4/PRP19* de *S.cerevisiae* como um componente abundante da matriz nuclear (Gotzmann *et al.*, 2000) permite, discutir uma possível função adicional para Pso4p. A matriz nuclear, também conhecida como estrutura nuclear acromatínica ou não cromatínica (*nonchromatin nuclear scaffold*) é vista dinamicamente como uma estrutura formada por associações transientes proteína-proteína e proteína-DNA/RNA que intermediam processos de manutenção da estabilidade genômica, estrutura da cromatina/cromossomos, síntese de DNA/RNA e processamento, gerando uma estrutura tri-dimensional intranuclear altamente organizada com a definição de domínios ou territórios cromossômicos (Martini, 1998; Pederson, 1998, 2000; Ridgway, 2000; Ma, 1999). Outros estudos, têm demonstrado evidências da ligação

funcional entre a matriz nuclear, cromatina e reparação do DNA, relatando por exemplo, o recrutamento de DNA danificado para a porção da matriz nuclear após tratamento com radiação UVC (Koehler e Hanawalt, 1996) e a cinética da etapa de ressíntese de DNA, após incisão do DNA danificado fortemente associada à fração da matriz nuclear (Bouayadi *et al.*, 1995).

Como proposto no capítulo 2 (Discussão e modelo apresentado na Figura 7), Pso4p poderia representar o componente equivalente à hNMP200 de células humanas em *S. cerevisiae*, podendo, como provável membro da matriz nuclear, contribuir para o fornecimento de suporte e atuar nos diversos processos metabólicos envolvendo ácidos nucleicos (processamento de RNA, transcrição, replicação e reparação). O isolamento do gene Rlf2p, utilizando Pso4p como isca reforça a hipótese apresentada no modelo da Figura 7 do Capítulo 2 e constitui um bom exemplo da dinâmica funcional que pode estar associada à interface matriz nuclear-cromatina. Sendo um componente do complexo principal de montagem da cromatina em *S. cerevisiae* (yCAF1) (Enomoto *et al.*, 1997), Rlf2p executa uma dupla função: atua na replicação e também na reparação do DNA acoplada à montagem da cromatina (Zang *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001). Além disso, sua deleção torna as células de levedura sensíveis à radiação UVC e 8-MOP+UVA (Game *et al.*, 2000; capítulo 2). De forma interessante, a introdução de alelos *rlf2Δ* em linhagens mutantes para genes dos três principais grupos epistáticos de reparação em *S. cerevisiae*, torna duplos e triplos mutantes mais sensíveis à radiação UVC (Game *et al.*, 2000), demonstrando a importância da atuação Rlf2p na sua forma funcional associada à yCAF1 para assistir o processo de reparação do DNA em múltiplas vias.

Aderidos a componentes da matriz nuclear existem domínios repetidos de DNA de 50 a 200Kb que ficam ancorados através da interação de seqüências de DNA denominadas de regiões de adesão à matriz (do inglês: *Matrix Attachment Region* – MAR) (Gasser e Laemmli, 1986; Cockerill e Garrard, 1986; Roberge e Gasser, 1992). As seqüências MAR são regiões tipicamente ricas em AT, geralmente localizadas nas extremidades 5' e 3' dos genes, assim como dentro de introns, e são consideradas as seqüências de DNA que coordenam a transcrição e síntese de DNA dentro da matriz nuclear (Bode e Maass, 1988; Blasquez *et al.*, 1989; Cook, 1989, 1991, 1994; Dickson *et al.*, 1990; Phi-Van *et al.*, 1990; Berezney, 1991; Klehr *et al.*, 1991; Forrester *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 1999;). A revisão da literatura sobre esta estrutura intranuclear leva à percepção atual de que muitos dos

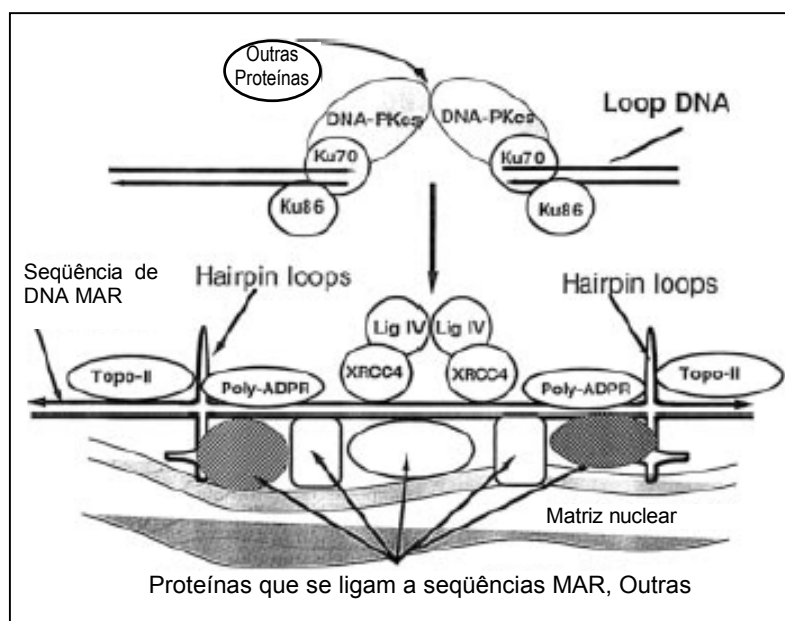
macrocomplexos envolvidos em processos nucleares existem como fábricas pré-montadas ancoradas à matriz nuclear (Maudin *et al.*, 2002).

Recentemente, enquanto o artigo que compõem o capítulo 2 estava em processo final de edição, Mauldin *et al.* (2002) publicaram na mesma revista o primeiro modelo de montagem de um complexo de reparação associado à matriz nuclear em células humanas (Figura 8). No modelo proposto, postula-se que a topoisomerase II, proteínas ligantes a seqüências MAR e outros componentes ainda desconhecidos produzem uma mudança secundária na estrutura das sequências MAR, ilustradas na Figura 8 o que resulta na formação de alças em forma de grampo e estruturas cruciformes. Esta estrutura permite o recrutamento da DNA ligase IV, XRCC4 (fosfoproteína que interage com a DNA ligase IV estimulando sua atividade), poli (ADP-ribose) Polimerase (enzima que se liga a DNA danificado e RNA associado a regiões ativamente transcritas) e outras proteínas que se organizam em um complexo de reparação. Ocorrendo quebras duplas na cadeia do DNA, o heterodímero Ku70/Ku86 liga-se às extremidades e recruta a subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKcs, envolvida em recombinação não homóloga V(D)J) e possivelmente outras proteínas. Este complexo ligado às extremidades da quebra dupla na cadeia do DNA então se associa com o complexo aderido às sequências MAR onde a reparação da lesão ocorre por um processo de recombinação não-homóloga. Este modelo fornece bases para melhor compreender a dinâmica do processo de reparação intimamente associado à matriz nuclear em células de mamíferos. Entretanto, como sequências MAR e ortólogos de DNA-PKcs ainda não foram caracterizadas em *S. cerevisiae*, o papel preciso da matriz nuclear nos processos de reparação neste organismo ainda necessita maior investigação.

#### **4.4. Integrando a participação de Pso2p na reparação de ICLs em *S. cerevisiae***

Utilizando análises genéticas e moleculares, resultados de pesquisas nos últimos vinte anos têm fornecido subsídios para integrar o papel do gene *PSO2* dentro dos três grandes grupos de epistasia **RAD3**, **RAD6** e **RAD52** e especificamente dentro dos processos de reparação de lesões do tipo ICL (Henriques e Brendel, 1990; Henriques *et al.*, 1997; Brendel e Henriques, 2001). No entanto, apesar de ter sido extensivamente estudado

(Henriques e Brendel, 1990; Henriques *et al.*, 1997; Brendel e Henriques, 2001) o papel de do gene *PSO2* assim como de outros genes similares em outras espécies (Dronkert e Kannar, 2001; Moshous *et al.*, 2001; Tavtigian *et al.*, 2001) na reparação de lesões ICL ainda é pouco conhecido. A transcrição do gene *PSO2* é dependente da integridade da sequência regulatória DRE (*Damage Responsive Element*) e especificamente induzida por agentes indutores de ICLs bifuncionais (8-metoxipsoraleno, cisplatina, HN2) e não por agentes monofuncionais (HN1, MMS) (Wolter *et al.*, 1996), indicando que os mecanismos que regulam a sua indução são específicos e não resultado de uma resposta geral a estresse da célula. A sensibilidade e indução observada nos tratamentos com acetaldeído (ACA) são indicativos de que este metabólito natural resultante da atividade fermentativa de leveduras é capaz de gerar danos do tipo ICL em *S. cerevisiae*, confirmando a ação genotóxica e potencial já descrita para esta substância (Matsuda *et al.*, 1998). Identificando novos fenótipos de sensibilidade ao ACA e utilizando o sistema dois-híbridos (como já mencionado anteriormente e no capítulo 3) foi possível estender geneticamente e molecularmente a caracterização do gene *PSO2* e seu envolvimento com a reparação de ICLs.



**Figura 8.** Modelo de complexos de reparação do DNA associados à matriz nuclear. (modificado de Mauldin *et al.*, 2002).

Alguns dos genes envolvidos no reparo de ICLs não se classificam adequadamente a uma das três principais vias de reparação do DNA em *S. cerevisiae* (Henriques *et al.*, 1997). O gene *PSO2*, pelas suas respostas fenotípicas particulares é um exemplo de um desses casos (Henriques e Moustacchi, 1981; Richter *et al.*, 1992). *PSO2* é um membro da via NER com respeito a lesões produzidas por agentes monofuncionais e formadores de ICLs e mostra a mesma preferência que *RAD3* para o reparo de regiões ativamente transcritas (Henriques e Moustacchi, 1981; Siede e Brendel 1981; Meniel *et al.*, 1995; Henriques *et al.*, 1997). Entretanto, com respeito a tratamentos com agentes indutores de ICLs, o gene *PSO2* comporta-se de forma epistática à *REV3*, a DNA polimerase Zeta ( $\zeta$ ) da via de reparação pós replicativa mutagênica, a qual é sinérgica à genes da via NER (Henriques e Moustacchi, 1981). Mutantes *pso2* mostram mutagênese reduzida após tratamentos com agentes formadores de ICLs o que também sugere que Pso2p está envolvida na via de reparação sujeita a erro. (Cassier *et al.*, 1980; Cassier e Moustacchi, 1981; Cassier *et al.*, 1985). De forma similar a mutantes da via de reparação pós-replicativa sujeita a erro mas em contraste com mutantes da via NER, mutantes *pso2* são capazes de incisar ICLs e produzir quebras duplas na cadeia do DNA, mas são incapazes de reconstituir DNA de alto peso molecular. (Magaña-Schwenke *et al.*, 1982; Wilborn e Brendel, 1989). A recombinação induzida é também reduzida em mutantes *pso2* após tratamento com 8-MOP+UVA, mas não após tratamento com HN2 (Saeki *et al.*, 1983). Além disso, a reparação de lesões do tipo ICL em plasmídios exógenos não é defectiva em mutantes *pso2* em contraste com mutantes da via NER e recombinacional, sugerindo que a atividade de Pso2p pode estar relacionada com modulação da estrutura cromossomal (Maganã-Schwenke e Averbeck, 1991). Em vista do exposto Pso2p poderia atuar em uma via alternativa específica para reparação de ICLs que não pertence à via recombinacional ou pós-replicativa sujeita a erro, podendo ainda atuar como integrador, facilitando a incisão pela via NER e direcionando substratos intermediários para as vias recombinacionais ou pós-replicativa sujeita a erros.

Até o momento não existem evidências de que a proteína codificada pelo gene *PSO2* associa-se ou faça parte de um complexo multi-proteico para processamento e remoção sequencial de lesões do tipo ICL ou se esta proteína poderia atuar em complexos fisicamente separados como por exemplo o reparossoma (Habraken *et al.*, 1996) e o recombinossoma (Hays *et al.*, 1995). A recente caracterização da proteína codificada pelo

gene tipo *PSO2* Artemis na espécie humana, funcionalmente associada a subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKcs), para efetuar a reparação de quebras duplas de cadeia, permite no entanto, discutir se associação semelhante pode ocorrer em *S. cerevisiae*. Artemis é o ortólogo humano do gene *PSO2* de *S. cerevisiae* melhor estudado até o momento. Mutações neste gene foram identificadas em pacientes portadores de imunodeficiência severa combinada com sensibilidade à radiação (RSCID), os quais possuem defeitos na recombinação do tipo V(D)J e conseqüente incapacidade de finalizar os processos de maturação de células B e T do sistema imune (Moshous *et al.*, 2001). Em uma outra investigação mais recente, Ma *et al.* (2002) demonstraram que Artemis está envolvida no processo de recombinação V(D)J, especificamente na etapa de abertura de extremidades seladas, geradas como substratos intermediários pelo complexo RAG1/RAG2, possuindo também atividade nucleolítica em extremidades protudentes 5' e 3'. Adicionalmente, estes mesmos autores mostraram que a atividade catalítica hidrolásica de Artemis é dependente de sua contínua associação com DNA-PKcs. Quando complexada e fosforilada pela DNA-PKcs, Artemis adquire a sua atividade catalítica essencial para a etapa de abertura das extremidades de DNA seladas no processo de recombinação V(D)J e no processamento das extremidades 5'e 3' na recombinação não homóloga em células humanas.

Em vista do exposto, o isolamento de proteínas quinases via sistema dois-híbridos utilizando Pso2p (Tabela 2, Capítulo3) como isca, pode significar que uma associação semelhante entre Pso2p e Pak1p seja equivalente à relatada para a proteína humana Artemis. Como ortólogos de DNA-PKcs ainda não foram identificados em *S. cerevisiae* e parecem ser exclusivos de metazoários (Mewes *et al.*, 2000), outras proteínas quinases como Pak1p poderiam atuar em conjunto com Pso2p para direcionar uma atividade enzimática capaz de auxiliar na remoção de lesões do tipo ICL. No entanto ainda é preciso investigar, se uma associação semelhante é necessária para reparação do DNA proficiente em *S. cerevisiae*.

#### 4.5. Pso2p como membro da família $\beta$ -CASP de proteínas envolvidas em metabolismo de DNA

Uma família separada dentro da superfamília de proteínas contendo dobramento e assinaturas características de metalo- $\beta$ -lactamases foi recente denominada de  $\beta$ -CASP (Callebaut *et al.*, 2002). O domínio  $\beta$ -CASP (*metallo- $\beta$ -lactamase-associated CPSF Artemis SNM1/PSO2*) foi identificado em membros desta família em posição ajustante à assinatura altamente conservada de metalo- $\beta$ -lactamases (HxHxDH) e contém três resíduos de aminoácidos em posições conservadas denominados de motivos A, B e C, correspondendo respectivamente aos aminoácidos D ou E, H e H ou V (Callebaut *et al.*, 2002, Capítulo 3). Esta nova família inclui proteínas dos três grandes grupos de organismos (Eucarya, Bacteriae e Archaea) e de acordo com as informações reunidas, especializadas em substratos de ácidos nucleicos (Callebaut *et al.*, 2002). A análise detalhada das seqüências dos membros desta família permitiu distinguir os membros que especificamente atuam em substratos de DNA dos que interagem com RNA, de acordo com o aminoácido conservado posicionado no motivo C, o qual é sempre uma histidina em proteínas RNA-específicas ao passo que nas proteínas DNA-específicas (denominadas como do grupo PSO2) é o amino hidrofóbico valina (Callebaut *et al.*, 2002). Estas análises permitiram a identificação de 13 genes codificando proteínas pertencentes ao grupo PSO2 existentes nos bancos de dados até o momento (Callebaut *et al.*, 2002). Destas seqüências depositadas nos bancos de dados, 3 são da espécie humana (Artemis, FLJ12810 e KIAA0086), 2 de *Mus musculus* (BC011094 e SNM1), 1 de *Drosophila melanogaster* (CG10018), 1 de *Caenorhabditis elegans* (F39H2.1), 5 de *Arabidopsis thaliana* (F14D16.17, F17L21.20, At1g66730, orf12 e F17K2.23), 1 de *S. cerevisiae* (PSO2) e 1 de *Schizosaccharomyces pombe* (C56F8.17C), mas somente 4 foram investigadas em maior detalhe (Artemis, KIAA0086, SNM1 e PSO2) e apenas 3 (PSO2, SNM1 e Artemis) já possuem relatos de funções associadas a fenótipos, todos envolvidos com mecanismos de reparação do DNA (Henriques e Mostacchi, 1981; Demuth e Digweed, 1988; Dronkert *et al.*, 2000; Moshous *et al.*, 2001). No entanto, Callebaut *et al.* (2002) não incluíram em suas análises o gene humano ELAC2 (Tavtigian *et al.*, 2001) identificado cerca de um ano antes. Mutações no gene ELAC2 foram associadas à predisposição ao câncer de próstata e sua caracterização também revelou similaridade com metalo- $\beta$ -lactamases assim como

com o gene *PSO2* de *S.cerevisiae*. Portanto, embora ELAC2 não apresente de forma aparente maior grau similaridade com os membros da família  $\beta$ -CASP grupo *PSO2*, este gene representa mais um exemplo de que as proteínas codificadas por este grupo de genes compartilham uma arquitetura funcional importante que se manteve conservada durante a evolução.



## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

## CONCLUSÕES

Apesar do genoma da levedura *S. cerevisiae* já estar totalmente seqüenciado desde 1996 (Goffeau *et al.*, 1996), a função da maioria dessas ORFs ainda permanece desconhecida. Os estudos de interações proteicas, utilizando o sistema dois-híbridos, assim como métodos de purificação por afinidade, têm contribuído para a elucidação de muitas funções dessas proteínas e os primeiros mapas de interações funcionais foram gerados recentemente (Schwikowski *et al.* 2000; Uetz *et al.*, 2000; Gavin *et al.*, 2002). Entretanto, interações conhecidas e implicadas com reparação de DNA como por exemplo envolvendo o gene RAD2 (membro do subcomplexo NEF3 da via de reparação NER - Habraken *et al.*, 1996), não foram identificadas por investigações em grande escala utilizando o sistema dois-híbridos (Uetz *et al.*, 2000) ou por metodologias de purificação por afinidade em grande escala (Gavin *et al.*, 2002). Estes dados demonstram que apesar dos ensaios em grande escala contribuírem muito para a compreensão global das interações funcionais celulares, somente estudando especificamente grupos pequenos de genes pode-se observar e explorar resultados muitas vezes desprezados quando investigados em grande escala. Previligiando-se somente as interações fortes e altamente reproduzíveis, dados importantes de interações de menor expressão ou fracas são desprezados.

Este trabalho representa mais uma contribuição ao estudo de interações entre proteínas em *S. cerevisiae* e, além disso, fornece novos resultados para melhor compreender e situar funcionalmente o papel dos genes *PSO2* e *PSO4* na dinâmica dos processos de reparação do DNA neste microrganismo modelo, permitindo concluir que:

*No estudo do gene PSO4:*

1) existe uma correlação clara entre o efeito da mutação *pso4-1* com a temperatura de crescimento, eficiência de processamento de pre-mRNA e fenótipos relacionados com genes portadores de introns;

2) a mutação detectada no alelo mutante *pso4-1* (L45S) está associada com o fenótipo pleiotrópico termocondicional, afeta a auto-interação de Pso4-1p (formação de um homotetrâmero), porém não altera a capacidade de Pso4-1p interagir com a proteína estabilizadora do complexo PRP19-AC Snt309p;

3) a principal função de Pso4p está no processamento de pre-mRNA, sendo a incapacidade de reparação proficiente do mutante *pso4-1* uma consequência indireta da indisponibilidade de proteínas codificadas por genes portadores de introns;

4) utilizando-se o sistema dois-híbridos e uma isca funcional de *PSO4*, foi possível isolar genes atuantes na reparação do DNA capazes de interagir também geneticamente com *PSO4* após tratamentos com mutágenos.

*No estudo do gene PSO2:*

1) a indução *in vivo* da expressão da  $\beta$ - Galactosidase dirigida pelo promotor do gene *PSO2* após exposição ao acetaldeído, reforça o fato de que este gene é um indutor natural de pontes inter-cadeia;

2) a interação entre Pso2p e Pak1p pelo sistema dois-híbridos foi reforçada pela análise da sobrevivência em simples de duplos mutantes após tratamentos com agentes mutagênicos e sugere *PAK1* como um novo locus envolvido na reparação de DNA em *S. cerevisiae*;

3) a integridade do domínio conservado  $\beta$ -CASP de Pso2p é essencial para reparação proficiente de DNA contendo ICLs e também para manutenção da capacidade de interação física com seus interatores Pak1p e Yhr080cp;

## PERSPECTIVAS

### Perspectivas direcionadas ao estudo do gene *PSO4/PRP19*

Combinações de experimentos capazes de fornecer mais dados para esclarecer se Pso4p/Prp19p faz parte da matriz nuclear em *S. cerevisiae* e explorar melhor o seu papel na reparação do DNA podem ser viabilizados produzindo-se linhagens portadoras de alelos mutantes e selvagens fusionados a etiquetas fazendo uso de metodologias de modificação gênica baseadas na PCR e plasmídios específicos desenvolvidos para este fim (Longtine *et al.*, 1998). Fusões a etiquetas como por exemplo GFP (do inglês *Green Fluorescent Protein*), 3HA (epitopo específico da Hemaglutinina do vírus Influenza), 13Myc (epitopo codificado por *c-myc*) e glutationa S-transferase (GST) poderão:

- 1) permitir a imunodeteção e/ou imunoprecipitação de Pso4p em preparações de frações da matriz nuclear e da cromatina *in vitro*;
- 2) viabilizar a imunodeteção e localização subcelular específica *in situ* de Pso4p em células de levedura preparadas para microscopia;
- 3) identificar a localização subcelular de Pso4p e de seus possíveis interatores *in situ* em preparações de células tratadas e não tratadas com agentes causadores de lesões no DNA através de Microscopia de Imunofluorescência ou Microscopia Confocal;
- 4) permitir avaliar o efeito da mutação *pso4-1* na montagem do complexo PRP19-AC através de purificação por afinidade diferencial dos componentes do complexo em extratos celulares de *S. cerevisiae*;
- 5) investigar a possibilidade da mutação L45S introduzir um possível sítio de fosforilação na proteína alterada Pso4-1p *in vitro*. Esta abordagem pode ser complementada com simulações *in silico* e relacionadas com a cinética de montagem do oligotetrâmero Pso4p/Prp19p no complexo PRP19-AC

### Perspectivas direcionadas ao estudo do gene *PSO2*

Dado que o ortólogo humano de *PSO2* forma um complexo funcional com a DNA-PKcs (Ma *et al.*, 2002) e em virtude de ainda não sido identificado uma proteína ou complexo protéico de função equivalente à DNA-PKcs em *S. cerevisiae* (Mewes *et al.*,

2000), analisar sistematicamente as possíveis interações genéticas entre linhagens simples e duplos mutantes para os genes envolvidos nos mecanismos de recombinação não homóloga *yKU70*, *yKU80*, *YCD1*, *MRE11*, *DNL4*, *XRS2*, *RAD50* e *LIF1* (Mewes *et al.* 2000), torna-se relevante para agregar informações sobre a função de *PSO2* no reparo de ICLs. Como não é descartado um papel regulatório para *PSO2* no processo de reparação de ICLs em levedura, a mesma estratégia pode também ser implementada para genes atuantes na rede de respostas a danos no DNA (*DDC1*, *MEC3*, *RAD17*, *MGM101*, *RFA2*) (Ho *et al.*, 2002).

Para definir melhor a alocação do gene *PAK1*, assim como verificar o efeito de outros interatores de Pso2p identificados (YHR080c, YJL084c e YLR387c) nas principais vias de reparação do DNA, análises genéticas de simples e duplos mutantes em combinação com genes representativos destas vias, poderão produzir resultados importantes. A determinação das posições e tipos de mutações nos alelos mutantes *pso2-1* e *pso2-11* (ver revisão em Brendel e Henriques, 2001) poderão contribuir para a identificação de resíduos/domínios importantes não somente para a manutenção de interações proteicas mas também para a reparação de DNA proficiente.

Alternativamente, a utilização de uma estratégia de triagem de mutações sinteticamente letais em combinação com alelos *pso2Δ* também representa uma possibilidade de gerar dados biologicamente relevantes, uma vez que constitui-se de um ensaio *in vivo* comprovadamente útil para detecção de interações proteicas (Kranz e Holm, 1990). Além disso, a utilização de metodologias e experimentos similares aos descritos para *PSO4*, utilizando linhagens mutantes contendo fusões de alelos do gene *PSO2* a etiquetas, poderão não somente contribuir para confirmar as interações detectadas pelo sistema dois-híbridos, mas também identificar a localização subcelular de Pso2p e de seus possíveis interatores *in situ*, antes e após tratamento com agentes causadores de lesões no DNA, através de Microscopia de Imunofluorescência ou Microscopia Confocal. Os mesmos tipos de construções podem ainda permitir a purificação da proteína para avaliar se Pso2p é capaz de se ligar a substratos de DNA *in vitro*.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, H.H.R.; MOUSTACCHI, E.E.; HENRIQUES, J.A.P. The *PSO3* gene is involved in error-prone intragenic recombinational DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 219, p. 75-80, 1989.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (eds.) **Curr. Protocols in Mol. Biol.**, New York: Wiley, 1995.
- AVERBECK, D. Photochemistry and photobiology of psoralens. **Proc. Jpn. Invest. Dermatol.**, v. 8, p. 52-73, 1984.
- AVERBECK, D. Recent advances in psoralen phototoxicity mechanism. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 50, p. 859-882, 1989.
- AVERBECK, D.; DARDALHON, M.; MAGAÑA-SCHWENCKE, N.; MEIRA, L.B.; MENIEL, V. New aspects of the repair and genotoxicity of psoralen photoinduced lesions in DNA. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, v. 14, p. 47-63, 1992.
- BAILLY, V.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Domains required for dimerization of yeast Rad6 ubiquitin-conjugating enzyme and Rad18 DNA binding protein. **Mol. Cell Biol.**, v. 17, p. 4536-4543, 1997.
- BANG, D.D.; VERHAGE, R.; GOOSEN, N.; BROUWER, J.; VAN DE PUTTE, P. Molecular cloning of *RAD16*, a gene involved in differential repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 2, p. 3925-3931, 1992.
- BALAJEE, A.S.; BOHR, V.A. Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair. **Gene**, v. 250, p. 15-30, 2000.
- BENATEN, A.; BEAM, C.A. The genetic control of X-ray resistance in budding yeast cells. **Radiat. Res.** v. 69, p. 99-116, 1977.
- BENFATO, M.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. The DNA repair gene *PSO3* of *Saccharomyces cerevisiae* belongs to the *RAD3* epistasis group. **Curr Genet.** v. 21, p. 85-90, 1992.
- BENHAMOU, S.; SARASIN, A. Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. **Mutat. Res.**, v. 462, p. 149-158, 2000.
- BEREZNEY, R. Visualizing DNA replication sites in the cell nucleus. **Semin. Cell Biol.**, v. 2, p. 103-115, 1991.
- BLASQUEZ, V., XU, M., MOSES, S. AND GARRARD, W. Immunoglobulin kappa gene expression after stable integration. I. Role of the intronic MAR and enhancer in plasmacytoma cells. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 21183-21189, 1989.
- BOCKING, T.; BARROW, K.D.; NETTING, A.G.; CHILCOTT, T.C.; COSTER, H.G.; HOFER, M. Effects of singlet oxygen on membrane sterols in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 1607-1618, 2000.
- BODE, J. AND MAASS, K. Chromatin domain surrounding the human interferon-beta gene as defined by scaffold-attached regions. **Biochemistry**, v. 27, p. 4706-4711, 1998.

- BRAITHWAITE, E.; WU, X.; WANG, Z. Repair of DNA lesions: mechanisms and relative repair efficiencies. **Mutat. Res.**, v. 424, p. 207-219, 1999.
- BRENDEL, M.; HAYNES, R.H. Interactions among genes controlling sensitivity to radiation and alkylation in yeast. *Mol. Gen. Genet.*, v. 125, p. 197-216, 1973.
- BRENDEL, M.; GREY, M.; MARIS, A.F.; HIETKAMP, J.; FESÜS, Z.; PICH, C.T.; DAFRÉ, A.; SCHMIDT, M.; ECKARDT-SCHUPP, F.; HENRIQUES, J.A.P. Low glutathione pools in the original *pso3* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* are responsible for its pleiotropic sensitivity phenotype. **Curr. Genet.**, v. 33, p. 4-9, 1998.
- BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. The *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. **Mutat. Res.**, v. 489, p. 79-96, 2001.
- BROSMANOVA, J.; VLCKOVA, V.; FARKASOVA, E.; DUDAS, A.; VLASAKOVA, D.; CHOVANEC, M.; MIKULOVSKA, Z.; FRIDRICOVA, I.; SAFFI, J.; HENRIQUES. 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.
- BRYK, M.; BANERJEE, M.; MURPHY, M.; KNUDSEN, K.E.; GARFINKEL, D.J.; CURCIO, M.J. Transcriptional silencing of Tyl elements in the *RDN1* locus of yeast. **Genes. Dev.**, v. 11, p. 255-269, 1997.
- 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- $\beta$ -lactamase fold within nucleic acids processing enzymes: the  $\beta$ -CASP family. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, p. 3592-3601, 2002.
- CARDONE, J.M.; MACHADO, R.M.; REVERS, L.F.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Psoralen-Sensitive Mutant *pso9-1* of *Saccharomyces cerevisiae* Contains a Mutant Allele of the DNA Damage Checkpoint Gene *MEC3*. ( em preparação para submissão)
- CASSIER, C.; CHANET, R.; HENRIQUES, J.A.P.; MOUSTACCHI, E. The effects of the three *PSO* genes on induced mutagenesis: a novel class of mutationally defective yeast. **Genetics**, v. 100, p. 841-857, 1980.
- CASSIER, C.; MOUSTACCHI, E. Mutagenesis induced by mono- and bi-functional alkylating agents in yeast mutants sensitive to photoaddition of furocumarins (*pso*). **Mutat. Res.**, v. 84, p. 37-47, 1981.
- CASSIER, C.; CHANET, R.; MOUSTACCHI, E. Repair of 8-methoxypsoralen photo-induced cross-links and mutagenesis: role of the different repair pathways in yeast. *Photochem. Photobiol.* v. 41 p. 289-294, 1985.
- CASSIER, C.; MOUSTACCHI, E. Allelism between *pso1-1* and *rev3-1* mutants and between *pso2-1* and *snm1* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v.13, p. 37-40, 1988.



- CHAN, G.L.; DOETSCH, P.W.; HASELTINE, W.A. Cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts block polymerization by DNA polymerase I. **Biochemistry**, v. 24, p. 5723-5728, 1985.
- CHEN, C.H.; TSAI, W.Y.; CHEN, H.R.; WANG, C.H.; CHENG, S.C. Identification and characterization of two novel components of the Prp19p-associated complex, Ntc30p and Ntc20p. **J. Biol. Chem.** v. 276, p. 488-494, 2001
- CHEN, C.H.; YU, W.C.; TSAO, T.Y.; WANG, L.Y.; CHEN, H.R.; LIN, J.Y.; TSAI, W.Y.; CHENG, S.C. Functional and physical interactions between components of the Prp19p-associated complex. **Nucleic Acids Res.** v. 30, p. 1029-1037.
- CHENG, S.C.; TARN, W.Y.; TSAO T.Y.; ABELSON J. Prp19: a novel spliceosomal component. **Mol. Cell Biol.**, v. 13, p.1876-1882, 1993.
- CLARK, T.A.; SUGNET, C.W.; ARES Jr., M. Genewide analysis of mRNA processing in yeast using splicing-specific microarrays. **Science**, v. 296, p. 907-910, 2002.
- CLEVER, B.; INTERTHAL, H.; SCHMUCKLI-MAURER, J.; KING, J.; SIGRIST, M.; HEYER, W-D. Recombinational repair in yeast: functional interactions between Rad51 and Rad54 proteins. **EMBO J.** v.16, p. 2535-2544, 1997.
- COCKERILL, P.N.; GARRARD, W.T. Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. **Cell**, v.44, p. 273-282, 1986.
- CONSTANZO, M.C.; CRAWFORD, M.E.; HIRSCHMAN, J.E.; KRANZ, J.E.; OLSEN, P.; ROBERTSON, L.S. SKRZYPEK, M.S.; BRAUN, B.R.; HOPKINS, K.L. KONDU, P.; et al., YPDTM, PombeTM and WormTM: model organism volumes of the BioKnowledgeTM library, na integrated resource for protein information. **Nucleic Acids Res.** v. 29, p. 75-79, 2001.
- COOK, P.R. The nucleoskeleton and the topology of transcription. **Eur. J. Biochem.**, v.185, p. 487±501, 1989.
- COOK, P.R. The nucleoskeleton and the topology of replication. **Cell**, v. 66, p. 627-635, 1991.
- COOK, P.R. RNA polymerase: structural determinant of the chromatin loop and the chromosome. **Bioessays**, 16, 425±430. (1994
- 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.
- DAVIS, C.A.; GRATE, L.; SPINGOLA, M.; ARES Jr., M. Test of intron predictions reveals novel splice sites, alternatively spliced mRNAs and new introns in meiotically regulated genes of yeast. **Nucleic Acids Res.** v. 28, p. 1700-1706, 2000.
- DEMUTH, I.; DIGWEED, M. Genomic organization of a potential human DNA-crosslink repair gene, *KIAA0086*. **Mutat. Res.**, v. 409, p. 11-16, 1998.
- DICKINSON,P., COOK,P.R. AND JACKSON,D.A. Active RNA polymerase I is fixed within the nucleus of HeLa cells. **EMBO J.**, v. 9, p. 2207-2214, 1990.

- DOHMEN, R.J.; MADURA, K.; BARTEL, B.; VARSHAVSKY, A. The N-end-rule is mediated by the UBC2 (RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 7351-7355, 1991.
- DOLGANOV GM *et al.* Human Rad50 is physically associated with human Mre11: identification of a conserved multiprotein complex implicated in recombinational DNA repair. **Mol Cell Biol** v. 16, p4832-4841, 1996.
- DRESSER, M.E. Meiotic chromosome behavior in *Saccharomyces cerevisiae* and (mostly) mammals. **Mutat Res.**, v. 451, p. 107-127, 2000.
- DRONKERT, M.L.G.; KANAAR, R. Repair of DNA interstrand cross-links. **Mutat. Res.**, v. 486, p. 217-247, 2001.
- ENOMOTO, S.; McCUNE-ZIERATH, P.D.; GERAMI-NEJAD, M.; SANDERS, M.A.; BERMAN, J. RLF2, a subunit of the yeast chromatin assembly factor-I, is required for telomeric chromatin function *in vivo*. **Genes & Dev.**, v. 11, p. 358-370, 1997.
- FELDMANN, H; Winnacker, E.L. A putative homologue of the human autoantigen Ku from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** v. 268, p. 12895-12900, 1993.
- 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.
- FORRESTER,W., VAN GENDEREN,C., JENUWEIN,T. AND GROSSCHEDL,R. Dependence of enhancer-mediated transcription of the immunoglobulin mu gene on nuclear matrix attachment regions. **Science**, v. 265, p. 1221-1225, 1994.
- FRAMONT-RACINE, M.; MAYES, A.E.; Brunet-Simon, A.; RAIN, J.C.; COLLEY, A.; DIX, I.; DECOURTY, L.; JOLY, N.; RICARD, F.; BEGGS, J.D.; LEGRAIN, P. Genome-wide protein interactions screens reveal functional networks involving SM-like proteins. **Yeast**, v. 17, p. 95-110, 2000.
- FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W. **DNA repair and mutagenesis**. Washington: ASM Press, USA, 1995.
- GAME, J.C.; COX, B.S. Allelism tests of mutants affecting sensitivity to radiation in yeast and a proposed nomenclature. **Mutat. Res.**, v. 12, p. 328-331, 1971.
- GAME, J.C.; COX, B.S. Epistatic interactions between four *Rad* loci in yeast. **Mutat. Res.**, v. 16, p. 353-362, 1972.
- GAME, J.C.; MORTIMER, R.K. A genetic study of X-ray sensitive mutants in yeast. **Mutat. Res.**, v. 24, p. 281-292, 1974.
- GAME, J.C. DNA double-strand breaks and the *RAD50-RAD57* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Semin. Cancer Biol.**, v. 4, p. 73-83, 1993.
- GAME J.C. The *Saccharomyces* repair genes at the end of the century. **Mutat. Res.**, v. 451, p. 277-293, 2000.
- GASPARRO, F.P.; LIAO, B.; FOLEY, P.J.; WANG, X.M.; McNIFF, J. M. Psoralen photochemotherapy, clinical efficacy, and photomutagenicity: the role of molecular epidemiology in minimizing risks. **Envir. Mol. Mutag.**, v. 31, p. 105-112, 1998.

- GASSER, S.M.; LAEMMLI, U.K. Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. **Cell**, v. 46, 521-530, 1986.
- GAVIN, A.C.; BÖSHE, M.; KRAUSE, R.; GRANDI, P.; MARZIOCH, M.; BAUER, A.; SCHULTZ, J.; RICK, J.M.; MICHON, A.M.; CRUCIAT, C.M.; REMOR, M.; HÖFERT, C.; SCHLEDER, M.; BRAJENOVIC, M.; RUFFNER, H.; MERINO, A.; KLEIN, K.; HUDAK, M.; DICKSON, D.; RUDI, T.; GNAU, V.; BAUCH, A.; BASTUCK, S.; HUHSE, B.; LEUTWEIN, C.; HEURTIER, M.A.; COPLEY, R.; EDELMANN, A.; QUERFURTH, E.; RYBIN, V.; DREWES, G.; RAID, M.; BOUWMEESTER, T.; BORK, P.; SERAPHIN, B.; KUSTER, B.; NEUBAUER, G.; SUPERT-FUGA, G. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes **Nature** v. 415, p. 141-147, 2002.
- GOFFEAU, A.; BARRELL, B.G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J.D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E.J.; MEWES, H.W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S.G.. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, p. 546-547, 1996.
- GOTZMANN, J.; GERNER, C.; MEISSNER, M.; HOLZMANN, K.; GRIMM, R.; MIKULITS, W.; SAUERMAN, G. hNMP200: a novel human common nuclear matrix protein combining structural and regulatory functions. **Exp. Cell. Res.** v. 261, p. 166-179, 2000.
- GREY, M.; DÜSTERHÖFT, A.; HENRIQUES, J.A.P.; BRENDEL, M. Allelism of *PSO4* and *PRP19* links pre-mRNA processing with recombination and error-prone rDNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 24, p. 4009-4014, 1996.
- GUZDER, S.N.; BAILLY, V.; SUNG, P.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Yeast DNA repair protein *RAD23* promotes complex formation between transcription factor TFIIH and DNA damage recognition factor RAD14. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 8385-8388, 1995.
- GUZDER, S.N.; SUNG, P.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Yeast Rad7-Rad16 complex, specific for the nucleotide excision repair of nontranscribed DNA strand, is a ATP-dependent DNA damage sensor. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 21665-21668, 1997.
- GUZDER, S.N.; SUNG, P.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. The DNA-dependent ATPase activity of yeast nucleotide excision repair factor 4 and its role in DNA damage recognition. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 6292-6296, 1998.
- GUZDER, S.N.; SUNG, P.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Synergistic interaction between yeast nucleotide excision repair factors NEF2 and NEF4 in the binding of ultraviolet-damaged DNA. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 24257-24262, 1999.
- HAAS, A.; REBACK, P.M.; PRATT, G.; RECHSTEINER, M. Ubiquitin-mediated degradation of histone H3 does not require the substrate-binding ubiquitin protein ligase, E3, or attachment of polyubiquitin chains. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 21664-21669, 1990.
- HAASE, E.; RIEHL, D.; MACK, M.; BRENDEL, M. 1989. Molecular cloning of *SNM1*, a yeast gene responsible for a specific step in the repair of cross-linked DNA. **Mol. Gen. Genet.**, v. 218, p. 64-71, 1989.

- HABRAKEN, Y.; SUNG, P.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Yeast DNA-repair gene *RAD2* encodes a single-stranded endonuclease. **Nature** v. 366, p. 365-368, 1993.
- HAYS, S.L.; FIRMENICH, A.A.; BERG, P. Complex formation in yeast double-strand break repair: participation of Rad51, Rad52, Rad55 and Rad57 proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.92, p. 6925-6929, 1995.
- HENRIQUES, J.A.P.; MOUSTACCHI, E. Isolation and characterisation of *pso* mutants sensitive to photoaddition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 95, p. 273-288, 1980.
- HENRIQUES, J.A.P.; MOUSTACCHI, E. Interaction between mutations for sensitivity to psoralen photoaddition (*pso*) and to radiations (*rad*) in yeast. **J. Bacteriol.**, v. 148 p. 248-256, 1981.
- HENRIQUES, J.A.P.; VICENTE, E.J.; da SILVA, K.V.C.L.; SCHENBERG, A.C.G.; HENRIQUES, J.A.P. *PSO4*: a novel gene involved in error-prone repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 218, p. 111-124, 1989.
- HENRIQUES, J.A.P.; BRENDDEL, M. The role of *PSO* and *SNM* genes in dark repair of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 18, p. 387-393, 1990.
- HENRIQUES, J.A.P.; BROZMANOVA, J.; BRENDDEL, M. Role of *PSO* genes in the repair of photoinduced interstrand cross-links and photooxidative damage in the DNA of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, v. 39, p. 185-196, 1997.
- HIETER, P. The yeast genome and clinical genetics. **Clin. Genet.**, v. 54, p. 113-116.
- HEYER WD and KOLODNER RD Enzymology of homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, v. 46, p. 221-271, 1993.
- HO, Y. GRUHLER, A., HEILBUT, A., BADER, G.D., MOORE, L., ADAMS, S.L., MILLAR, A., TAYLOR, P., BENNETT, K., BOUTILLER, K., YANG, L., WOLTING, C., DONALDSON, I., SCHANDORF, S., SHEWNARANE, J., VO, M., *et al.* Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. **Nature** v. 415, p.180-183, 2002.
- HOEIJMAKERS, J.H.J. Nucleotide excision repair II: from yeast to mammals. **Trends Genet.**, v. 9, p. 211-217, 1993.
- HUANG, H.; KAHANA, A.; GOTTSCHLING, D.E.; PRAKASH, L.; LIEBMAN, S.W. The ubiquitin-conjugating enzyme Rad65 (Ubc2) is required for silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 17, p. 6693-6699, 1997.
- HUANG, H.; JOO, Y.H.; BUECK, C.; LIEBMAN, S.W. Host genes that affect the target-site distribution of the yeast retrotransposon, Tyt. **Genetics**, v. 151, p. 1393-1417, 1999.
- HÜBSCHER, U.; NASHEUER, H.-P.; SYVÄOJA, J.E. Eukaryotic DNA polymerases, a growing family. **TIBS**, v. 25, p. 143-147, 2000.
- ITO, T.; TASHIRO, K.; MUTA, S.; OSAWA, R.; CHIBA, T. NISHIZAWA, M. YAMAMOTO, K.; KUHARA, S.; SAKAKI, Y. Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid

- interactions in all possible combinations between the yeast proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, p. 1143-1147, 2000.
- ITO, T.; CHIBA, T. OZAWA, R.; YOSHIDA, M.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.98, p. 4569-4574, 2001.
- JENTSCH, S.; McGRATH, J.P.; VARSHAVSKY. The yeast DNA repair gene *RAD6* encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. **Nature**, v. 329, p. 131-134, 1987.
- JOHNSON, R.E.; KONDRATICK, C.M.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. *hRAD30* mutations in the variant form of *Xeroderma pigmentosum*. **Science**, v. 285, p. 263-265, 1999a.
- JOHNSON, R.E.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase Pol  $\epsilon$ . **Science**, v. 283, p. 1001-1004, 1999b.
- JOHZUKA, K.; OGAWA, H. Interaction of Mre11 e Rad50: two proteins required for DNA repair e meiosis-specific double-strand break formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** v. 139, p. 1521-1532, 1995.
- KANAAR R *et al.*. Human and mouse homologs of the *Saccharomyces cerevisiae RAD54* DNA repair gene: evidence for functional conservation. **Curr Biol.**, v. 6, p. 828-838, 1996.
- KANAAR, R.; HOEIJMAKERS, H.J.; van GENT, D.C. Molecular mechanisms of double strand break repair. **Trends Cell Biol.** v. 9, p. 483-489, 1998.
- KISER, G.L.; WEINERT, T.A. *GUF1*, a gene encoding a novel evolutionarily conserved GTPase in budding yeast. **Yeast**, v. 11, p. 1311-1316, 1995.
- KLEHR, D.; MAASS, K.; BODE, J. Scaffold-attached regions from the human interferon beta domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters. **Biochemistry**, v. 30, p. 1264-1270, 1991.
- KOEHLER, D.R.; HANAWALT, P.C. Recruitment of damaged DNA to the nuclear matrix in hamster cells following ultraviolet irradiation. **Nucleic Acids Res.**, 24, 2877±2884. 1996.
- KOKEN, M.H.; REYNOLDS, P.; JASPERS-DEKKER, I.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S.; BOOTSEMA, D.; HOEIJMAKERS, J.H. Structural and functional conservation of two human homologs of the yeast DNA repair gene *RAD6*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 8865-8869, 1991.
- KRANZ, J.E.; HOLM, C. Cloning by function: an alternative approach for identifying yeast homologs of genes from other organisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, p. 6629-6633, 1990.
- KREJCI, L.; DAMBROSKY, J.; THOMSEN, B.; DUNO, M.; BENDIXEN, C. Molecular dissection of interactions between Rad51 and members of the recombination repair group. **Mol. Cell. Biol.** v. 21, p. 966-976, 2001.
- KUNZ, B.A.; STRAFFON A.F.L.; VONARX E.J. DNA damage-induced mutation: tolerance via translesion synthesis. **Mutat. Res.**, v. 451, p. 169-185, 2000.
- KUPIEC, M. Damage-induced recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 451, p. 91-105, 2000.

- LAAT, W.L. de; JASPERS, N.G.J.; HOEIJMAKERS, J.H.J. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. **Genes & Development**, v. 13, p. 768-785, 1999.
- LAWRENCE, C.W. Mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Adv. Genet.**, v. 21, p. 173-254, 1982.
- LAWRENCE, C.W. The RAD6 DNA repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: what does it do, and how does it do it? **Bioessays**, v. 16, p. 253-258, 1994.
- LAWRENCE, C.W.; HINKLE, D.C. DNA polymerase zeta and the control of DNA damage induced mutagenesis in eukaryotes. **Cancer Surveys**, v. 28, p. 21-31, 1996.
- LAWRENCE, C.W.; GIBBS, P.E.M.; MURANTE, R.S.; WANG, X.-D.; LI, Z.; McMANUS, T.P.; McGREGOR, W.G.; NELSON, J.R.; HINKLE, D.C.; MAHER, V.M. Roles of DNA polymerase  $\zeta$  and Rev1 protein in Eukaryotic Mutagenesis and Translesion Replication. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. **Biological responses to DNA Damage**. v. LXV, p. 61-69, 2000.
- LEMONTT, J.F. Mutants of yeast defective in mutation induced by ultraviolet light. **Genetics**, v. 68, p. 21-33, 1971.
- LEMONTT, J.F. Induction of forward mutations in mutationally defective yeast. **Mol. Gen. Genet.**, v. 119, p.27-42, 1972.
- LESSER, C.F. GUTHRIE, C. Mutational analysis of pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae* using a sensitive new reporter gene, *CUP1*. **Genetics**, v. 133, p. 851-863, 1993.
- LIEBMAN, S.W.; NEWNAM, G. A ubiquitin-conjugating enzyme, RAD6, affects the distribution of Tyl retrotransposon integration positions. **Genetics**, v. 133, p. 499-508, 1993.
- LIPPKE, J.A.; GORDON, L.K.; BRASH, D.E.; HASELTINE, W.A. Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, p. 3388-3392, 1981.
- LONGTINE, M.S.; MCKENZIE III, A.; DEMARINE, D.J.; SHAH, N.G.; WACH, A.; BRACHAT, A.; PHILIPPSEN, P.; PRINGLE, J.R. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, p. 953-961, 1998.
- MA, H.; SIEGEL, A.J.; BEREZNEY, R. Association of chromosome territories with the nuclear matrix. Disruption of human chromosometerritories correlates with the release of a subset of nuclear matrix proteins. **J. Cell Biol.**, v. 146, p. 531-542, 1999.
- MA, Y.; PANNICKE, U.; SCHWARS, 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.
- MACHADO, R.M. Caracterização fenotípica e genotípica de novos mutantes *pso* (*pso8-1* e *pso9-1*) de *Saccharomyces cerevisiae*, sensíveis à fotoadição de psoralenos. Porto Alegre, UFRGS. 100p, 2000 Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Bioquímica.

- MAGAÑA-SCHWENCKE, N.; HENRIQUES, J.A.P.; CHANET, R.; MOUSTACCHI, E. The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced cross-links in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair deficient strains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 79, p. 1722–1726, 1982.
- 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.
- MARTINI, E.; ROCHE, D.M.; MARHEINEKE, K.; VERREAULT, A. ALMOUZNI, G. Recruitment of phosphorylated chromatin assembly factor 1 to chromatin after UV irradiation of human cells. **J. Biol. Chem.**, v. 143, p. 563-575, 1998.
- MASUTANI, C.; KUSUMOTO, R.; YAMADA, A.; DOHMAE, N.; YOKOI, M.; YUASA, M.; ARAKI, M.; IWAI, S.; TAKIO, K.; HANAOKA, F. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature*, v. 399, p. 700-704, 1999.
- MATSUDA, T.; KAVANISHI, M.; YAGI, T.; MATSUI, S.; TAKEBE, H. Specific tandem GG to TT base substitutions induced by acetaldehyde are due to intra-strand crosslinks between adjacent bases. **Nucleic Acids Res.** v. 26 p. 1769-1774, 1998.
- MAULDIN, S.K.; GETS, R.C.; LIU, W.; STAMATO. DNA-PK-dependent dinging of DNA ends to plasmids containing nuclear matrix attachment region DNA sequences: evidence for assembly of a repair complex. **Nucleic Acids Res.** v. 30, p. 4075-4087, 2002.
- MEIRA, L.B.; FONSECA, M.B.; AVERBECK, D.; SCHENBERG, A.C.G.; HENRIQUES, J.A.P. The *ps04-1* mutation reduces spontaneous mitotic gene conversion and reciprocal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 235, p. 311-316, 1992.
- MEIRA, L.B.; MAGAÑA-SCHWENCKE, N.; AVERBECK, D.; HENRIQUES, J.A.P. Involvement of the *PSO3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* in intrachromosomal mitotic recombination and gene amplification. **Mol. Gen. Genet.**, v. 245, p. 750-759, 1994.
- MELLON, I.; HANAWALT, P.C. Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. **Nature**, v. 342, p. 95-98, 1989.
- MENIEL, V.; MAGAÑA-SCHWENCKE, N.; AVERBECK, D. Preferential repair in *Saccharomyces cerevisiae rad* mutants after induction of interstrand cross-links by 8-methoxypsoralen plus UVA. **Mutagenesis**, v. 10, p. 543–548, 1995.
- MEWES, H.W.; FRISHMANN, D.; GRUBER, C.; GEIER, B.; HAASE, D.; KAPS, A.; LEMCKE, K.; MANNHAUPT, G.; PFEIFER, F.; SCHULLER, C.; STOCKER, S.; WEIL, B. MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Res.*, v. 28, p. 37-40, 2000.
- MILNE, G.T.; WEAVER, D.T. Dominant negative alleles of *RAD52* reveal a DNA repair/recombination complex including Rad51 and Rad52. **Genes Dev.** v.7 p. 1755-1765, 1993.

- MORAIS, M.A. Jr.; VICENTE, E.J.; BROZMANOVA, J.; SCHENBERG, A.C.G.; HENRIQUES, J.A.P. Further characterisation of the yeast *pso4-1* mutant: interactions with *rad51* and *rad52* mutant after photoinduced psoralen lesions. **Curr. Genet.**, v. 29, p. 211-218, 1996.
- MORRISON, A.; CHRISTENSEN, R.B.; ALLEY, J.; BECK, A.K.; BERNSTINE, E.G.; LEMONTT, J.F.; LAWRENCE, C.W. *REV3*, a yeast gene whose function is required for induced mutagenesis, is predicted to encode a nonessential DNA polymerase. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 5659-5667, 1989.
- 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.
- MOUSTACCHI, E. Photomutagenicity induced by psoralens: mechanism of repair and photomutagenicity. **Arch. Toxicol.**, v. 12, p. 26-34, 1988.
- MURIS, D.F.R.; BEZZUBOVA, O.; BUERSTEDDE, J.M.; VREEKEN, K.; BALAJEE, A.S.; OSGOOD, C.J.; TROELSTRA, C.; HOEIJMAKERS, J.H.; OSTERMANN, K. SCHMIDT, H, *et al.* Cloning of human and mouse genes homologous to *RAD52*, a yeast gene involved in DNA repair and recombination. **Mutat. Res. DNA repair** v. 315, p. 295-305, 1994.
- NELSON, J.R.; LAWRENCE, C.W.; HINKLE, D.C. Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase  $\zeta$ . **Science**, v. 272, p. 1646-1649, 1996.
- NICKOLOFF, J.A.; HOEKSTRA, M.F. **DNA damage and repair**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1998.
- OHI, M.D.; GOULD, K. Characterization of interactions among the Cellp-Prp19p-associated splicing complex. **RNA** v. 8, p. 798-815, 2002.
- PAESI-TORESAN, S.O.; PICH, C.T.; GREY, M.; KESZENMAN, D.; BRENDDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Gene *PSO5* of *Saccharomyces cerevisiae*, involved in repair of oxidative damage, is allelic to *RAD16*. **Curr. Genet.**, v. 27, p. 493-495, 1995.
- PÂQUES, F.; HABER, J.E. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol. Biol. Rev.**, v. 63, p. 349-404, 1999.
- PARK, M.S. Expression of human *RAD52* confers resistance to ionizing radiation in mammalian cells **J. Biol. Chem.** v. 270, p. 15467-15470, 1995.
- PARSHAD, R.; SANFORD, K.K. Radiation-induced chromatid breaks and deficient DNA repair in cancer predisposition. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 37, p. 87-96, 2001.



- PARSONS, B. J. Psoralen photochemistry. **Photochem. Photobiol.**, v. 32, p. 813-821, 1980.
- PEDERSON, T. Thinking about a nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* v. 277, p. 147-159, 1998.
- PHI-VAN, L. VON KRIES, J.P.; OSTERTAG, W.; STRATLING, W.H. The chicken lysozyme 5' matrix attachment region increases transcription from a heterologous promoter in heterologous cells and dampens position effects on the expression of transfected genes. **Mol. Cell. Biol.**, v. 10, p. 2302-2307, 1990.
- PICOLOGLOU, S.; BROWN, N.; LIEBMAN, S.W. Mutations in *RAD6*, a yeast gene encoding a ubiquitin-conjugating enzyme, stimulate retrotransposition. **Mol. Cell. Biol.**, v. 10, p. 1017-1022, 1990.
- PRAKASH, L. Lack of chemically induced mutation in repair-deficient mutants of yeast. **Genetics**, v. 78, p. 1101-1118, 1974.
- PRAKASH, L. The relation between repair of DNA and radiation and chemical mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 41, p. 241-248, 1976.
- PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Isolation and characterization of MMS-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 86, p. 33-55, 1977.
- PRAKASH, L. Characterisation of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of *rad6*, *rad18*, *rev3* and *rad52* mutations. **Mol. Gen. Genet.**, v.184, p. 471-478, 1981.
- PRAKASH, L. The structure and function of *RAD6* and *RAD18* repair genes of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genome**, v. 31, p. 597-600, 1989.
- PRAKASH, S.; SUNG, P.; PRAKASH, L. DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. **Annu. Rev. Genet.**, v. 27, p. 33-70, 1993.
- PRAKASH, S.; JOHNSON, R.E.; WASHINGTON, M.T.; HARACSKA, L.; KONDRATICK, C.M. ; PRAKASH L. Role of Yeast and human DNA polymerase  $\eta$  in error-free replication of damaged DNA. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. **Biological responses to DNA Damage**. v. LXV p. 51-59, 2000.
- PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Nucleotide excision repair in yeast. **Mutat. Res.**, v. 451, p. 13-24, 2000.
- PUNGARTNIK, C.; KERN, M.F.; BRENDDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Mutant allele *pso7-1*, that sensitizes *Saccharomyces cerevisiae* to photoactivated psoralen, is allelic with *COX11*, encoding a protein indispensable for a functional cytochrome c oxidase. **Curr. Genet.**, v. 36, p. 124-129, 1999.
- QUEROL, C.B.; PAESI-TORESAN, S.O.; MEIRA, L.B.; BRENDDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Isolation and characterisation of three mutants with increased sensitivity to photoactivated 3-carbethoxypsoralen in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 25, p. 407-411, 1994.
- RAMOTAR, D.; MASSON, J.-Y. *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair processes: an update. **Mol. Cell Biochem.**, v. 158, p. 65-75, 1996.

- REED, S.H.; YOU, Z.; FRIEDBERG, E.C. The yeast *RAD7* and *RAD16* genes are required for postincision events during nucleotide excision repair. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 29481-29488, 1998.
- RESNICK, M.A.; COX, B.S. Yeast as an honorary mammal. **Mutat. Res.**, v. 451, p. 1-11, 2000.
- RICHTER, D.; NIEGEMANN, E.; BRENDDEL, M. Molecular structure of the DNA cross-link repair gene *SNMI (PSO2)* of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 231, p. 194-200, 1992.
- RIDGWAY, P.; ALMOUZNI, G. CAF-1 and inheritance of chromatin states: at the crossroads of DNA replication and DNA repair. **J. Cell Sci.**, v. 113, p. 2647-2658
- ROBERGE, M. AND GASSER, S. DNA loops: structural and functional properties of scaffold-attached regions. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 419-423, 1992.
- RODARTE-RAMON, U.S.; MORTIMER, R.K.. Radiation-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation and genetic study of recombination-deficient mutants. **Radiat. Res.**, v. 49, p. 133-147, 1972.
- ROLLA, H.; GREY, M.; SCHIMIDT, C.; NIEGEMANN, E.; BRENDDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Mutant *pso9-1* of *Saccharomyces cerevisiae*, sensitive to photoactivated psoralens, UV radiation, and chemical mutagens, contains a *rad6* missense mutant allele. **Curr. Genet.**, v. 41, p. 217-223, 2002.
- ROUSH, A.A.; SUAREZ, M.; FRIEDBERG, E.C.; RADMAN, M.; SIEDE, W. Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *RAD30* encoding an *Escherichia coli* *DinB* homolog confers UV radiation sensitivity and altered mutability. **Mol. Gen. Genet.**, v. 257, p. 686-692, 1998.
- RUHLAND, A.; HAASE, E.; SIEDE, W.; BRENDDEL, M. Isolation of yeast mutants sensitive to the bifunctional alkylating agent nitrogen mustard. **Mol. Gen. Genet.**, v. 181, p. 346-351, 1981.
- 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.
- SAFFI, J.; PEREIRA, V.R.; HENRIQUES, J.A.P. Importance of the Sgs1 helicase activity in DNA repair of *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 37, p. 75-78, 2000.
- SAFFI, J.; FELDMANN, H.; WINNACKER, E.L.; HENRIQUES, J.A.P. Interaction of the yeast Pso5/Rad16 and Sgs1 proteins: influences on DNA repair and aging. **Mutat. Res.**, v. 486, p. 195-206, 2001.
- SAGE, E.; DOAN, T.L.; BOYER, V.; HELLAND, D.E.; KITTLER, L.; HELENE, C.; MOUSTACCHI, E. Oxidative DNA damage photoinduced by 3-carbethoxypsoralen and other furocoumarins: mechanisms of photooxidation and recognition by repair enzymes. **J. Mol. Biol.**, v. 209, p. 297-314, 1989.
- SANCAR, G.B.; SIEDE, W.; ZEELAND, A.A. Repair and processing of DNA damage: a summary of recent progress. **Mutat. Res.**, v. 362, p. 127-146, 1996.

- SCHILD, D.; GLASNER, B.J.; MORTIMER, R.K.; CARLSON, M.; LAURENT, B.C. Identification of *RAD16*, a yeast excision repair gene homologous to the recombinational repair gene *RAD54* and to the *SNF2* gene involved in transcriptional activation. **Yeast**, v. 8, p. 385–395, 1992.
- SCHMIDT, C.L.; GREY, M.; SCHMIDT, M.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Allelism of *Saccharomyces cerevisiae* genes *PSO6*, involved in survival after 3-CPs+UVA induced damage, and *ERG3*, encoding the enzyme sterol C-5 desaturase. **Yeast**, v. 15, p. 1503-1510, 1999.
- SCHWIKOWSKI, B.; UETZ, P.; FIELDS, S. A network of protein–protein interactions in yeast. **Nature Biotech.** v. 18, p. 1257-1261, 2000.
- SELBY, C.P.; SANCAR, A. Molecular mechanism of transcription repair coupling. **Science**, v. 260, p. 53-58, 1993.
- SHEN, Z.Y.; CLOUD, K.G.; CHEN, D.J.; PARK, M.S.; Specific interactions between the human Rad51 and Rad52 proteins. **J. Biol. Chem.** v.271, p. 148-152, 1996.
- SHINOHARA, A.; OGAWA, H.; OGAWA, T. Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. **Cell** v. 69, p. 457-470. (Erratum **Cell** v.71, p. 180 (1992), 1992.
- SHINOHARA, A et al. Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to *RAD51* and *recA*. **Nature Genet.** v.4, p. 239-243, 1993.
- SHINOHARA, A.; OGAWA, T. Stimulation by Rad52 of yeast Rad51- mediated recombination. **Nature**, v. 391, p. 404-407, 1998.
- SIEDE, W.; BRENDEL, M.; Isolation and characterization of yeast mutants with thermoconditional sensitivity to the bifunctional alkylating agent nitrogen mustard. **Curr. Genet.** v. 4, p. 145-149 1981.
- 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.
- SILVA, K.V.C.L.; MORAIS Jr., M.A.; HENRIQUES, J.A.P. The *PSO4* gene of *S. cerevisiae* is important for sporulation and the meiotic DNA repair of photoactivated psoralen lesions. **Curr. Genet.**, v. 27, p. 207-212, 1995.
- SMITH, G.C.M. Jackson, S.P. The DNA-dependent protein kinase. **Genes & Dev.** v. 13, p. 916-934, 1999.
- SINGH, J.; GOEL, V.; KLAR, A.J. A novel function of the DNA repair gene *rhp6* in mating-type silencing by chromatin remodeling in fission yeast. **Mol. Cell. Biol.**, v. 18, p. 5511-5522, 1998.
- SUNG, S.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. The RAD6 protein of *Saccharomyces cerevisiae* polyubiquitinates histones, and its acidic domain mediates this activity. **Genes Dev.**, v. 2, p. 1476–1485, 1988.
- SWEDER, K.S.; HANAWALT, P.C. Preferential repair of cyclobutane pyrimidine dimers in the transcribed strand of a gene in yeast chromosomes and plasmids is dependent on transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 10696-10700, 1992.
- SWEDER, K.S. Nucleotide excision repair in yeast. **Curr. Genet.**, v. 27, p. 1-16, 1994.

- TAVTIGIAN, S. V.; 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. FRANK, C. FRYE, S. GHAFFARI, J. S. GUPTA, R. HU, D. ILIEV, T. JANECKI, 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, AND L. A. CANNON-ALBRIGHT. A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. *Nat. Genet.* v.27, p. 172-180, 2001.
- TAYLOR, J.S.; GARRET, D.S.; COHRS, M.O. Solution-state structure of the Dewar pyriminone photoproduct of thymidyl-(3'-5')-thymidine. *Biochemistry*, v.27, p. 7206-7215, 1988.
- TAYLOR, E.M.; LEHMANN, A.R. Review: Conservation of eukaryotic DNA repair mechanisms. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 74, p. 277-286, 1998.
- THOMPSON, E.D. Effect of latered sterol composition on growth characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, v.120, p. 779-784, 1974.
- TSAI, W.Y.; CHOW, Y.T.; CHEN H.R.; HUANG, K.T.; HONG, R.I.; JAN, S.P.; KUO, N.Y.; TSAO, W.Y.; CHEN, C.H.; CHENG, S.C. Cef1p is a component of the Prp19p-associated complex and essential for pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* v. 274, p. 9455-9462, 1999.
- TSUTSUI, Y.; KHASANOV, F.K.; SHINAGAWA, H.; IWASAKI, H.; BASHKIROV, V. Multiple interactions among the components of the recombinational repair system in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* v. 159, p. 91-105, 2001.
- UETZ, P.; GIOT, L.; CAGNEY, G.; MANSFIELD, T.A.; JUDSON, R.S.; KNIGHT, J.R.; LOCKSHON, D.; NARAYAN, V.; SRINIVASAN, M.; POCHART, P.; QURESHI-EMILI, A.; LI, Y.; GODWIN, B.; CONOVER, D.; KALBFLEISCH, T.; VIJAYADAMODAR, G.; YANG, M.; JOHNSTON, M.; FIELDS, S.; ROTHBERG, J.M. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, v. 403, p. 623-627, 2000.
- Van HOFFEN; A.; NATARAJAN, A.T.; MAYNE, L.V.; Van ZEELAND, A.A; MULLENDERS, L.H.F.; VENEMA, J. Deficient repair of the transcribed strand of active genes in Cockayne's syndrome cells. *Nucleic Acids Res.*, v. 21, p. 5890-5895, 1993.
- VERHAGE, R.A.; VAN DE PUTTE, P.; BROUWER, J. Repair of rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*: RAD4-independent strand-specific nucleotide excision repair of RNA polymerase I transcribed genes. *Nucleic Acids Res.*, v. 24, p. 1020-1025, 1996.
- WATT, P.; LOUIS, E.; BORTS, R.; HICKSON, I. SGS1: a eukaryotic homolog of *E. coli* RecQ that interacts with topoisomerase II in vivo and is required for faithful chromosome segregation. *Cell*, v. 81, p. 253-260, 1995.
- WEI, X., SOMANATHAN, S., SAMARABANDU, J. AND BEREZNEY, R. Three-dimensional visualization of transcription sites and their association with splicing factor-rich nuclear speckles. *J. Cell Biol.*, v. 146, p. 543-558, 1999.

- 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. Genet.**, 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. DNA repair in eukaryotes. **Ann. Ver. Biochem.** v.65, p.135-167, 1996.
- WOOD, R.D. Nucleotide excision repair in mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 23465-23468, 1997.
- 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.
- ZHANG, Z.; SHIBARARA, K.; STILLMAN, B. PCNA connects DNA replication to epigenetic inheritance in yeast. **Nature**, v. 408, p. 221-225, 2000.

## **ANEXOS**

## **Anexo 1**

“O sistema dois-híbridos de *Saccharomyces cerevisiae*: variações e potencial para a análise funcional e montagem de redes interações proteína-proteína”



# O Sistema dois-híbridos de *Saccharomyces cerevisiae*

Variações e potencial para a análise funcional e montagem de redes de interações proteína-proteína

## Jenifer Saffi

Farmacêutica, Doutora em Ciências  
saffi@dna.cbiot.ufrgs.br

## Luís Fernando Revers

Biólogo, Mestre em Genética e Biologia Molecular  
Doutorando em Ciências  
revers@dna.cbiot.ufrgs.br

## João Antonio Pêgas Henriques

Doutor em Ciências Naturais  
Professor Titular de Biofísica  
pegas@dna.cbiot.ufrgs.br

Laboratório de Radiobiologia Molecular  
Centro de Biotecnologia da UFRGS  
Porto Alegre, RS

O sistema dois-híbridos (“two-hybrid system”) é um ensaio artificial da transcrição, que se baseia no princípio de que muitas proteínas, incluindo ativadores da transcrição, consistem de múltiplos domínios que funcionam independentemente. Quando domínios individuais são expressos separadamente e aproximados por meio de interações não covalentes, tais domínios podem funcionar coletivamente para reconstituir a atividade da proteína intacta. Ativadores da transcrição são, via de regra, proteínas bipartidas compostas de um domínio de ligação ao DNA (DLD) e de um domínio de ativação da transcrição (DA), que são funcionalmente independentes. A natureza modular dos ativadores da transcrição é explorada no sistema dois-

linhagem apropriada de *Saccharomyces cerevisiae* reconstitui a atividade do ativador da transcrição pela aproximação dos seus domínios funcionais mediados por interações entre X e Y. A interação é facilmente identificada pela expressão de um gene repórter regulado em *cis* por uma região promotora que contém sítios de ligação reconhecidos por DLD. A aplicação mais poderosa e difundida atualmente do sistema dois-híbridos para identificar proteínas interatoras é gerar híbridos DA-Y, onde Y corresponde ao espectro de proteínas codificado por uma biblioteca de cDNA ou fragmentos genômicos. A seleção positiva para colônia que expressem uma presa capaz de interagir com a isca é conseguida pelo uso de genes repórteres prototróficos (por exemplo, *HIS3* e *LEU2*), os quais são transcritos em resposta à interação *isca-presa*, complementando as marcas auxotróficas da linhagem de *S. cerevisiae* específica e permitindo o seu crescimento em meio seletivo. A ativação transcricional paralela de genes repórteres colorimétricos, tais como *lacZ*, serve para confirmar a especificidade da interação e também quantificá-la.

Uma vez que as interações proteína-proteína são críticas a muitos processos biológicos, desde a formação de estruturas celulares macromoleculares e complexos enzimáticos até a regulação de vias de transdução de sinal, diversas abordagens e modificações do sistema dois-híbridos, originalmente descrito por S. Fields e O. Song, em 1989, surgiram para a análise funcional (identificação) de interações potenciais proteína-proteína em diversos sistemas biológicos. Essa revisão tem o objetivo de apresentar

**Tabela 1.** Representantes comerciais de sistemas dois-híbridos

Representante	Website
Clontech	www.clontech.com
OriGene	www.origene.com
Invitrogen	www.invitrogen.com
Stratagene	www.stratagene.com

híbridos através da construção de proteínas de fusão que ligam uma proteína de interesse ao DLD para gerar um domínio de ligação ao DNA híbrido (DLD-X), comumente referido como *isca* (“bait”). Domínios de ativação da transcrição híbridos (DA-Y), comumente referidos como *presas* (“preys”), são geradas através da construção de proteínas de fusão ligando domínios de ativação da transcrição a uma proteína interatora conhecida. A co-expressão de DLD-X e DA-Y em uma



**Tabela 2.** Endereços da Internet com informações sobre dois-híbridos

Endereço da Internet	Informações
<a href="http://www.uib.no/aasland/two-hybrid.html">http://www.uib.no/aasland/two-hybrid.html</a>	informa diversos links para sistemas dois-híbridos
<a href="http://xanadu.mgh.harvard.edu:/brentlabweb/andyweb/m&amp;b.html">http://xanadu.mgh.harvard.edu:/brentlabweb/andyweb/m&amp;b.html</a>	artigo de R. Brent e A. Mendelsohn sobre as aplicações do sistema dois-híbridos na biotecnologia
<a href="http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/com_sources1.html">http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/com_sources1.html</a>	coleção de plasmídeos de fusão com LexA
<a href="http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/main_false.html">http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/main_false.html</a>	coleção de falsos positivos

uma síntese sobre algumas das variações do sistema dois-híbridos original, suas aplicações na análise funcional de interações proteína-proteína (e genômica/ proteômica), bem como divulgar o potencial dessa tecnologia na era pós-genômica.

### O sistema dois-híbridos original e seus derivados

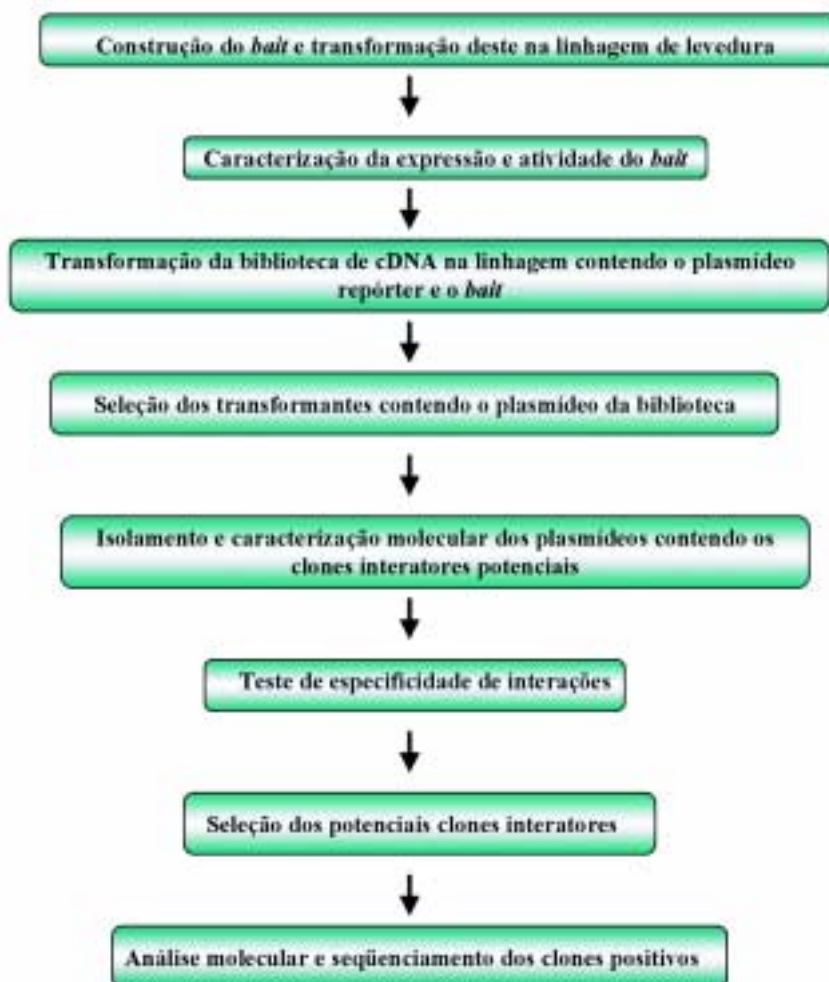
O sistema dois-híbridos básico evoluiu, na última década, para facilitar o seu uso em uma gama muito diversa de aplicações e, conseqüentemente, para facilitar ou prover a obtenção de dados para compreensão de interações protéicas mais complexas e variáveis. A figura 1A mostra um esquema do funcionamento básico do sistema dois-híbridos e algumas das variações surgidas. Todos esses sistemas apresentam três componentes básicos essenciais: 1º) vetores de levedura para a expressão de uma proteína conhecida fusionada ao DLD; 2º) vetores de levedura que direcionam a expressão de proteínas codificadas por um cDNA fusionado ao DA; e 3º) genes repórteres de levedura que contêm sítios de ligação para o DLD.

### Sistema três híbridos: co-expressão de enzimas modificadoras

Um exemplo da necessidade de introduzir variações na técnica originalmente descrita veio do fato de que muitas proteínas de organismos eucarióticos superiores sofrem extensivas modificações pós-traducionais as quais são essenciais para o correto desempenho funcional. Esse fato é particularmente problemático quando o gene

de interesse (*isca*) é, por exemplo, originário de vias de transdução de sinal de um organismo eucarioto superior. Nesses casos, modificações pós-traducionais criam sítios de reconhecimento críticos e necessários para as interações protéicas dessas cascatas.

A solução para esse problema foi co-expressar a (enzima fosforiladora) proteína quinase adequada para efetuar as modificações pós-traducionais juntamente com a *isca* e a *presa*, facilitando as modificações pós-traducionais ausentes em *S. cerevisiae*. De



Representação esquemática das etapas de um screening de dois-híbridos.

forma semelhante, outras modificações foram introduzidas para facilitar o estudo de interações protéicas dependentes de complexos multiméricos, nos quais uma determinada proteína possui mais afinidade de ligação/interação com outro complexo ou consequência de interações múltiplas de efeito cumulativo com outros complexos ou componentes distintos. Nesses casos, a co-expressão de um “parceiro molecular” previamente identificado pode prover uma interface de interação adequada para identificar outros componentes do complexo multimérico. A co-expressão de uma isca auxiliar para permitir a identificação de interações protéicas em complexos multiméricos foi então denominada de sistema três-híbridos (figuras 1B e 1C).

### Sistema dois-híbridos reverso

No sistema dois-híbridos original, as interações proteína-proteína são selecionadas positivamente pelo crescimento das colônias mediado pela transcrição dos genes repórteres. No sistema dois-híbridos reverso, a ativação da transcrição de genes repórteres de seleção negativa foi implementada para indicar perda de interação *isca-presa* (figura 1D). Entre os diferentes genes marcadores tóxicos para *S. cerevisiae*, os mais utilizados são *URA3* e *CYH2*. O gene repórter *URA3* é tradicionalmente o mais utilizado, porque permite ambas as seleções-positiva e negativa - em meio que contém ácido 5-fluoracético - 5-FOA, um análogo não-tóxico à enzima orotidina-5'- fosfato descarboxilase, codificada pelo gene *URA3* (cujas meta-

bolização leva à produção de 5-fluoracil, um produto tóxico) e em meio mínimo sem uracil, respectivamente. No caso do gene repórter *CYH2*, interações protéicas do tipo selvagem conferem sensibilidade à cicloheximida, permitindo, portanto, a seleção da perda de interação entre isca-presa.

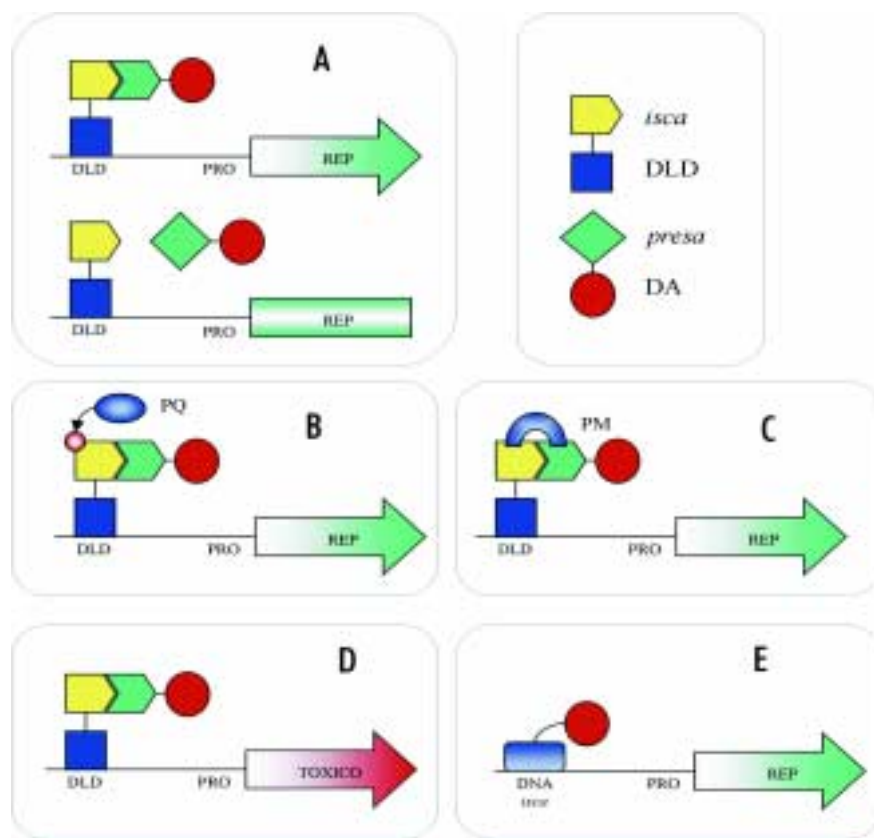
Essa variação do sistema dois-híbridos é especialmente aplicada no estudo específico de interações previamente determinadas, que permitem avaliar o grau de interação *isca-presa* e identificar os domínios responsáveis pela interação. Através desse sistema, é possível também selecionar mutações ou moléculas que dissociam ou previnem interações proteicas. Outra potencialidade dessa técnica é o seu emprego na terapêutica. Muitas doenças são causadas por disfunções mediadas por interações proteína-proteína, proteína-DNA ou receptor-ligante. A determinação dessas interações, seguida de um desenvolvimento de drogas e triagem de produtos capazes de atuar sobre essas interações representam uma área de pesquisa de ampla aplicação e significância farmacêutica.

### O sistema mono-híbrido

Os sistemas mono-híbridos foram desenvolvidos para identificar proteínas que interagem com uma seqüência específica de DNA (figura 1E). A estratégia inclui a utilização de genes repórteres similares aos do sistema dois-híbridos, que são regulados *cis* por uma cópia única ou multicópias em *tandem* de uma seqüência de DNA, que contém um domínio de ligação específico ou a região promotora de um determinado gene, por exemplo. Uma biblioteca de presas-DA, essencialmente equivalente à biblioteca do sistema dois-híbridos, é utilizada para identificar proteínas capazes de se ligarem ao domínio regulador e ativarem a transcrição do gene repórter.

### O sistema dois-híbridos na era pós-genômica

As recentes publicações de seqüências genômicas completas de diversos organismos têm produzido quantidades vastas de seqüências de



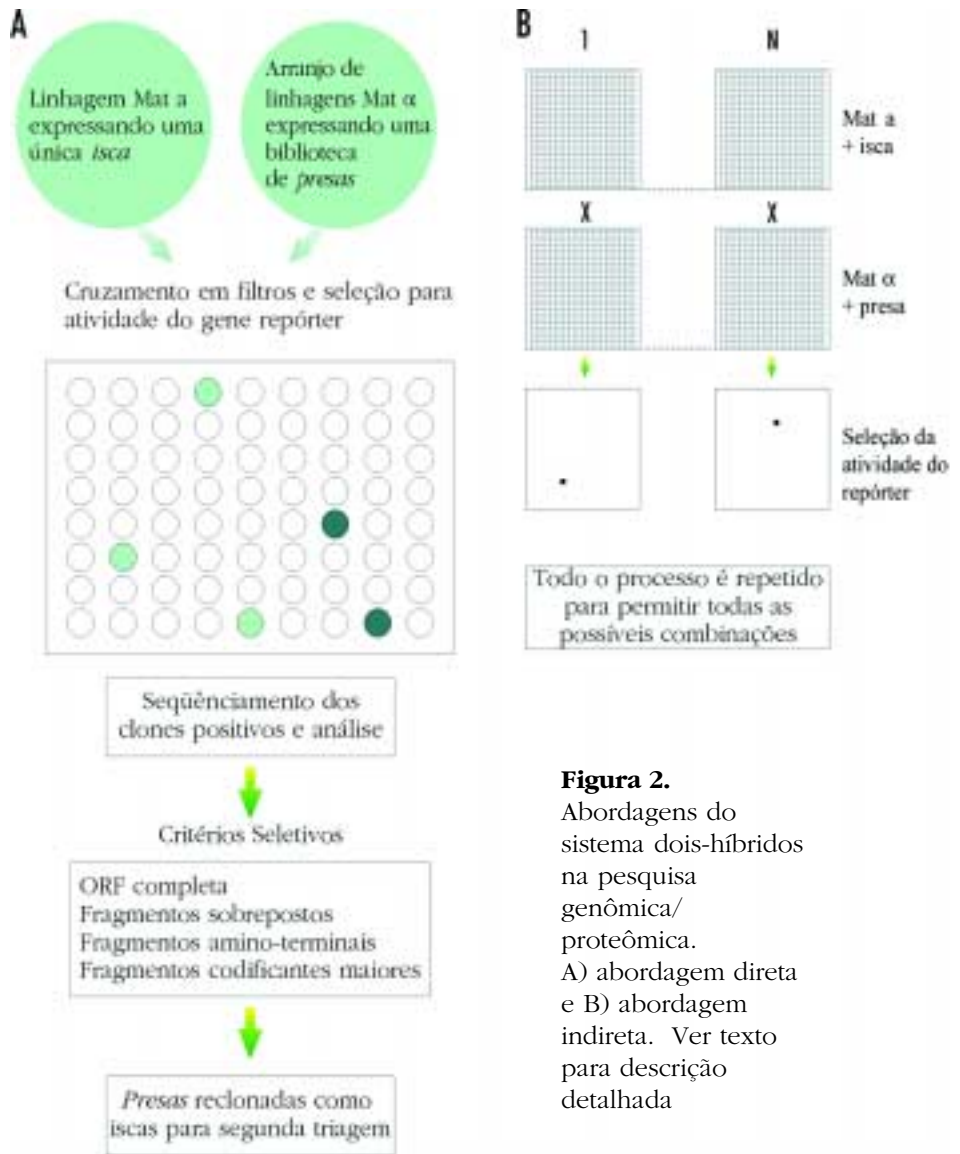
**Figura 1.** O sistema dois-híbridos e suas variações. A) Sistema dois-híbridos original mostrando a situação de interação e ausência de interação; B e C) Sistema três-híbridos; D) Sistema dois-híbridos reverso e E) Sistema mono-híbrido. REP = gene repórter; PRO = região promotora do gene repórter contendo os sítios de ligação da maquinaria de transcrição DLD = domínio de ligação ao DNA; DA = domínio de ativação da transcrição; PQ = proteína quinase; PM = proteína mediadora de interação

genes e das proteínas predictas codificadas por eles. Porém, a maioria das novas seqüências não compartilha homologia a proteínas já caracterizadas funcionalmente ou domínios proteicos conhecidos. Conseqüentemente, esses enormes bancos de dados ainda não possuem informações funcionais correspondentes às proteínas potencialmente codificadas por essas seqüências genômicas. Decifrar o papel funcional de cada gene seqüenciado representa o maior desafio da biotecnologia moderna na era pós-genômica. Sob essa perspectiva, o sistema dois-híbridos coloca-se como uma tecnologia de grande potencial a ser explorado.

O sistema dois-híbridos apresenta três grandes vantagens sobre outros ensaios alternativos para a identificação funcional de genes: baseado em um sistema genético de seleção poderoso em um organismo modelo, de biologia conhecida e fácil manipulação, como é o de *S. cerevisiae*, permite testar seqüências potencialmente codificadoras em grande escala, em experimentos relativamente simples e de baixo custo; além disso, a metodologia baseia-se em um ensaio conduzido *in vivo*, portanto, não é limitado por condições artificiais de ensaios realizados *in vitro*.

O isolamento de interações físicas com proteínas previamente caracterizadas funcionalmente pode ser indicativo de uma função potencial para a nova proteína e, conseqüentemente, servir para direcionar futuros experimentos. Essas abordagens, em combinação com análises bioinformáticas de conservação de seqüências e funções em diferentes organismos, podem efetivamente se complementar e contribuir para a elaboração de mapas de interações proteína-proteína em diferentes organismos.

Mundialmente, um número grande de grupos de pesquisa tem explorado a utilidade do sistema dois-híbridos para análise genômica/proteômica de genomas inteiros ou o mapeamento de todas as interações protéicas envolvidas em um processo celular específico como, por exemplo, o ciclo celular. Nesses projetos, duas abordagens têm sido basicamente utilizadas. A abordagem direta, conhecida como "mating assay", consiste em



**Figura 2.** Abordagens do sistema dois-híbridos na pesquisa genômica/proteômica. A) abordagem direta e B) abordagem indireta. Ver texto para descrição detalhada

efetuar o cruzamento da linhagem MATa de *S. cerevisiae* expressando uma única isca DLD-X com a linhagem MAT $\alpha$ , expressando uma biblioteca genômica de presas DA-Y. As interações isca-presas são, então, identificadas pela ativação dos genes repórteres. Clones positivos são seqüenciados e analisados criteriosamente para eliminar falsas interações. Os clones prioritários são subclonados como novas iscas e utilizados em novas triagens (figura 2A). Um exemplo representativo de abordagem indireta foi a metodologia empregada para análise do genoma de *S. cerevisiae*, onde arranjos de clones em linhagens MATa e MAT $\alpha$  de *S. cerevisiae* expressando os cerca de 6.000 genes genômicos como fusões DA-Y (presas) e DLD-X (iscas), respectivamente, foram cruzados e as interações selecionadas de acordo com a expres-

são dos genes repórteres. O processo inteiro é então repetido para obter todas as combinações possíveis entre DA-Y e DLD-X (figura 2B). Só em levedura, já foram identificadas em torno de 1.200 pares de interações e outros genomas já estão sendo estudados por esse sistema, como os de *Schizosaccharomyces pombe*, *C. elegans* e *Drosophila*.

### Limitações do sistema dois-híbridos

O sistema dois-híbridos exige expressão estável e, principalmente, o dobramento correto das proteínas híbridas. Embora foram introduzidas modificações na técnica para permitir modificações pós-traducionais, a expressão das proteínas híbridas pode não ser estável, não ter o dobramento correto ou até mesmo ser tóxica.

Uma metodologia muito utilizada e confiável para confirmar a interação de duas proteínas híbridas é testar a sua habilidade de manter a interação quando clonadas, reciprocamente, como *isca* e *presa*. A verificação da interação entre híbridos recíprocos (DLD-X x DA-Y e DLD-Y x DA-X) é um forte indicativo de uma interação com relevância biológica. Entretanto, outras evidências que suportem a interação verificada no sistema dois-híbridos são necessárias para mostrar que a interação é real. Técnicas bioquímicas e de imunohistoquímica são as mais utilizadas. A co-immunoprecipitação dos candidatos, através da expressão e purificação de proteínas etiquetadas com HA (hemaglutinina) ou GST (glutathione S transferase), são as técnicas de maior uso atualmente. A co-transfecção de linhagens de células de mamíferos contendo os cDNAs das duas proteínas de interesse para obter altos níveis de expressão, seguidas de coimmunoprecipitação, e/ou imunolocalização, também são empregadas para verificar e confirmar interações observadas pelo sistema dois-híbridos.

Algumas das limitações do sistema dois-híbridos nem sempre são relatadas na literatura. Entre elas, inclui-se um número muito alto de clones sem atividade biológica. Esses chamados “falsos positivos” podem ser reduzidos com a utilização de baixos níveis de expressão de proteínas híbridas e o uso de genes repórteres múltiplos, que contenham diferentes promotores. Por ser um ensaio artificial de transcrição, as interações encontradas por esse método devem ser inicialmente consideradas apenas como uma “hipótese de interação”, até que sejam validadas através de algum outro método de significância biológica. Quando uma mesma proteína é encontrada sendo interatora de várias iscas diferentes, é bastante provável tratar-se de uma “falsa interação” e, portanto, deve ser utilizada com bastante cautela. Exemplo comum de falsas interações são as proteínas de citoesqueleto, assim como proteínas envolvidas em transcrição.

Além da detecção de falsos positivos, também pode acontecer o opo-

to: interações já detectadas por outros métodos podem não aparecer em um ensaio de dois-híbridos; são os chamados “falsos negativos”. São vários também os motivos que levam ao aparecimento desses falsos negativos. Primeiro, DLD-X e DA-Y podem não se encontrar no núcleo. Segundo, as proteínas X e/ou Y podem não interagir em um contexto de fusão entre DLD e DA. Terceiro, a interação entre X e Y pode depender de modificação pós-translacional, que é ausente em uma célula de levedura. Por último, já foi detectado no sistema dois-híbridos, que um número de interações proteína-proteína só pode ser visualizada se X ou Y estiverem com domínios truncados. Estima-se que um percentual de até 45% de falsos negativos pode acontecer num sistema dois-híbridos. Isso sugere que as análises em larga escala sejam importantes para obtenção rápida e parcial de interações proteicas de um determinado proteoma de interesse. Entretanto, ainda precisam ser desenvolvidas, em larga escala, outras metodologias para a obtenção completa e segura de interações.

De qualquer maneira, esse é, sem dúvida nenhuma, um dos ensaios mais difundidos entre a comunidade científica na última década, gerando não só uma série de parceiros moleculares, mas, também, unindo pesquisadores de diversas áreas e de diversos lugares do mundo, com interesses comuns.

O Laboratório de Radiobiologia Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS começou, em 1996, a implementar a técnica original do sistema dois-híbridos para análise de interações entre proteínas codificadas pelos genes *PSO* e as proteínas de reparo de DNA de *Saccharomyces cerevisiae*. Vários *screenings* já foram realizados com sucesso no laboratório, revelando interações importantes, como entre o gene de reparo *PSO5/RAD16* e o *SGS1*, envolvido com envelhecimento precoce na levedura. Atualmente, já se dispõe de dois sistemas para triagem de interações proteicas, podendo-se ainda implementar com facilidade outras variações da técnica, conforme a abordagem experimental.

## Bibliografia Recomendada

Bartel P.L. e Fields S. (1997) The yeast two-hybrid system. Oxford University Press, 1st Ed., New York.

Colas P. e Brent R. (1998) The impact of two-hybrid and related methods on biotechnology. *Tibtech* 16: 355-363.

Drees B. L. (1999) Progress and variations in two-hybrid and three hybrid technologies. *Curr Opin Chem Biol* 3: 64-70.

Fashena S.J., Serebriiskii I., Golemis E. A. (2000) the continued evolution of two-hybrid screening approaches in yeast: how to outwit different preys with different baits. *Gene* 250: 1-14.

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

Goffeau A. (2000) Four years of post-genomic life with 6000 yeast genes. *FEBS Letters* 480: 37-41.

Ito T., Tashiro K., Muta S. *et al* (2000) Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins. *Proc Natl Acad Sci* 97: 1143-1147.

Legrain P. e Selig L. (2000) Genome-wide protein interaction maps using two-hybrid systems. *FEBS Letters* 480: 32-36.

Saffi, J. Feldmann H. Winnacker E. L. E Henriques J. A. P. (2001) Interaction of the yeast Pso5/Rad16 and Sgs1 proteins: influences on DNA repair and aging. *Mutat Res* (in press).

Topcu Z. e Borden K. L. B. (2000) The yeast two-hybrid system and its pharmaceutical significance. *Pharm Res* 17: 1049-1055.

Uetz P. e Hughes R. E. (2000) Systematic and large scale two-hybrid screens. *Curr Opin in Microbiol* 3: 303-308.

Uetz P., Glot L., Cagney G., Mansfield T., Judson R. S. *et al* (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403: 623-627.

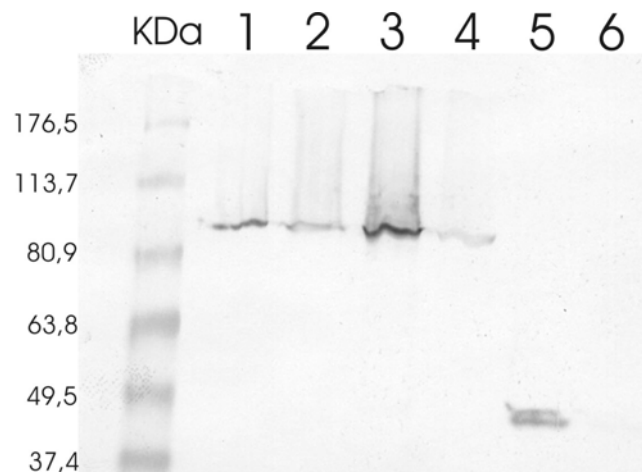
Vidal M. e Endoh H. (1999) Prospects for drug screening using the reverse two-hybrid system. *Tibtech* 17: 374-381.

## **Anexo 2**

Dados complementares não mostrados no artigo relatado no capítulo 2

## Avaliação da expressão das construções LexAPSO4/PRP19 e LexAPso4-1

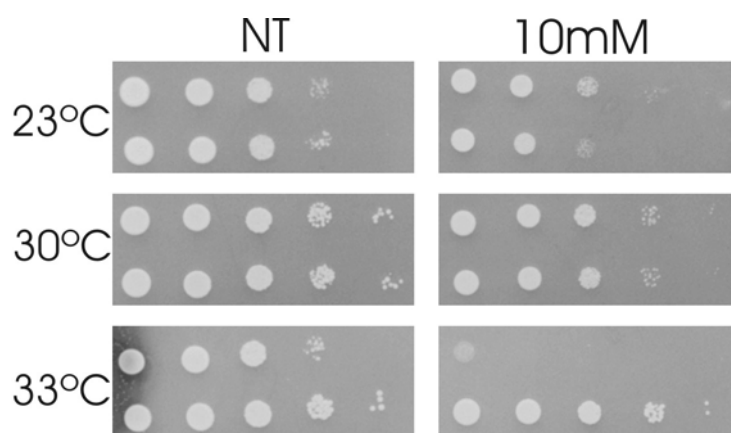
Western blot demonstrando que as construções no plasmídio pEG202 do sistema dois-híbridos contendo as fusões LexAPSO4/PRP19 e LexAPso4-1 (mutação L45S) se expressam corretamente quando transformadas na linhagem de *S. cerevisiae* EGY-48. A linhagem EGY48 foi transformada com ambas as construções LexAPSO4/PRP19, LexAPso4-1 e com o plasmídio controle (pRFHM1) contendo a fusão de LexA com o domínio dos aminoácidos 2 – 160 do gene *bicoid* de *Drosophila*. O protocolo baseou-se no manual do sistema dois-híbridos MatchMaker 3 da Clontech Laboratories com a utilização de um anticorpo monoclonal para LexA (Clontech Laboratories Inc.).



- 1) EGY48 + LexAPso4-1 (10µL extrato celular)
- 2) EGY48 + LexAPso4-1 (5µL extrato celular)
- 3) EGY48 + LexAPSO4/PRP19 (10µL extrato celular)
- 4) EGY48 + LexA PSO4/PRP19 (5µL extrato celular)
- 5) EGY48 + pHRFM1 (10µL extrato celular)
- 6) EGY48 (10µL extrato celular)

### **Teste de diluição serial para sensibilidade a $\text{CuSO}_4$ utilizando-se o plasmídio repórter pJU83.**

As linhagens MB 1620-5A e MB 1620 -5D foram transformadas com o plasmídio multicópia pJU83 contendo a construção repórter *ACT1-CUPI* (Lesser e Guthrie, 1993). Culturas serialmente diluídas destas linhagens foram plaqueadas em meio sintético completo (sem uracil para seleção de pJU83) com e sem adição de  $\text{CuSO}_4$  (10mM) e incubadas nas temperaturas indicadas por pelo menos 3 dias.



NT: sem adição de  $\text{CuSO}_4$

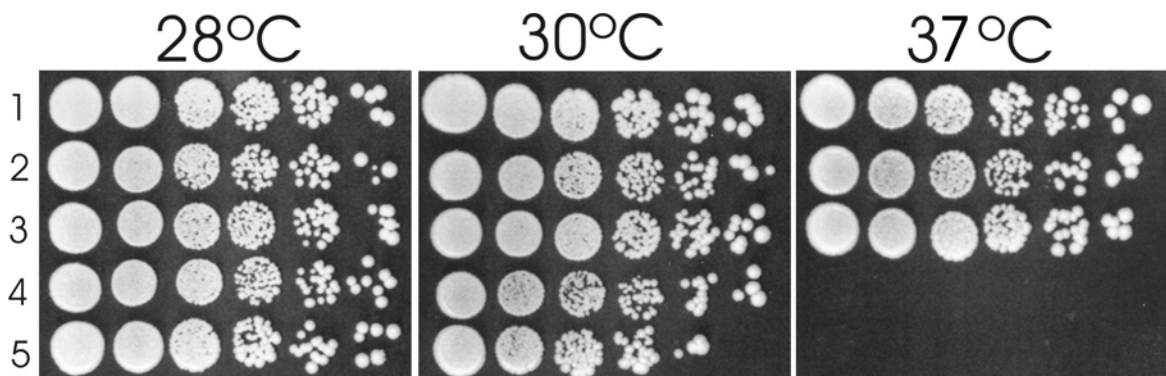
10mM: adição de  $\text{CuSO}_4$  para a concentração final indicada

Linhas superiores: MB 1620-5A

Linhas inferiores: MB 1620-5D

## A superexpressão de Pso4-1p complementa a sensibilidade a temperatura na linhagem MB 1620-5A

A linhagem MB 1620-5A foi transformada com uma série de plasmídios contendo as seqüências codificadoras do genes *PSO4/PRP19*, *Pso4-1* e *SNT309*. Culturas serialmente diluídas foram plaqueadas em meio YEPD e incubadas nas temperaturas indicadas por dois dias. Os vetores utilizados para superexpressão foram: pMG480 (pRS426 contendo o fragmento genômico do gene *PSO4/PRP19* provido por M. Grey (Frankfurt - Alemanha), pAT-Pso4-1 e pAH-SNT309. Os plasmídios da série pAT (TRP1) e pAH (HIS3) foram cedidos por H. Feldmann (München – Alemanha). pAT e pAH são plasmídios simples cópia (CEN ARS) e ambos contém a região promotora e terminadora do gene *ADHI* flanqueando um sítio múltiplo de clonagem, onde foram inseridas as sequencias codificadoras dos alelos *Pso4-1* e *SNT309* para superexpressão.

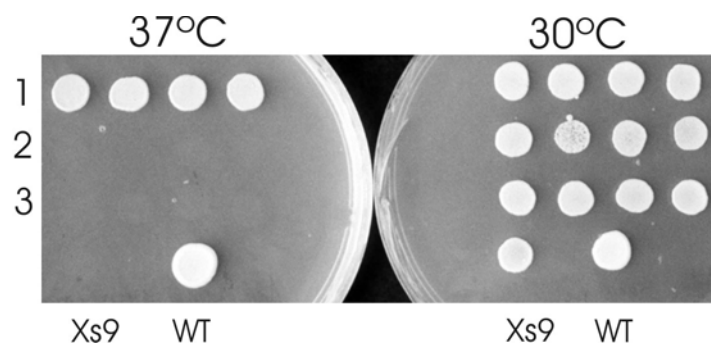


- 1) MB 1620-5A + pMG480
- 2) MB 1620-5A + pAT Pso4-1 + pAH SNT309
- 3) MB 1620-5A + pAT Pso4-1 + pAH
- 4) MB 1620-5A + pAT + pAH SNT309
- 5) MB 1620-5A + pAT + pAH



**Ensaio de complementação a 37°C na linhagem MB 1620-5A  
utilizando as construções LexAPSO4/PRP19 e LexAPso4-1.**

A linhagem MB 1620-5A foi transformada com os plasmídios pLexAPSO4/PRP19 e PlexAPso4-1. Culturas das linhagens portando as diferentes construções e controles foram plaqueadas em meio sintético completo e incubadas nas temperaturas indicadas por dois dias.



1) MB 1620-5A + pLexAPSO4/PRP19

2) MB 1620-5A + pLexAPso4-1

3) MB 1620-5A + pEG202

Xs9) Linhagem mutante original *psa4-1* (Xs9) (Benatem e Beam, 1979)

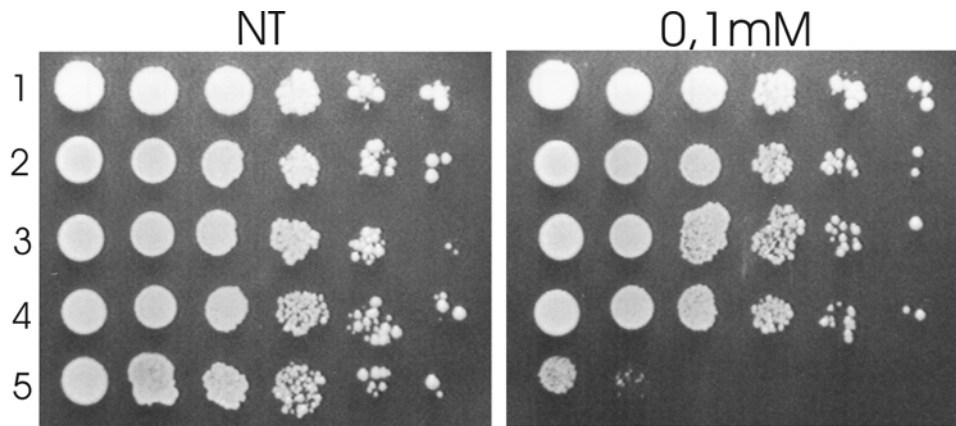
WT) MB 1620 -5D

## **Anexo 3**

Dados complementares não mostrados no artigo relatado no Capítulo 3

## Complementação ao fenótipo de sensibilidade à cisplatina na linhagem mutante *psa2* EH 3846-4A

A linhagem EH 3846-4A foi transformada com a construção LexAPSO2-A e o plasmídio vazio pEG202. Utilizou-se como controle a linhagem selvagem EH 3714-2B. Culturas serialmente diluídas de três diferentes transformantes e linhagens controle foram plaqueadas em meio sintético completo contendo cisplatina na concentração final 0,1mM e incubadas a 30°C por dois dias.



- 1) EH 3714-2B
- 2) EH 3846-4A + LexAPSO2-A
- 3) EH 3846-4A + LexAPSO2-A
- 4) EH 3846-4A + LexAPSO2-A
- 5) EH 3846-4A + pEG202

**Sensibilidade a diferentes agentes mutagêncios para os interatores  
de Pso2p YHR080c e YJL084c**

Linhagem	Cafeína (1mg/mL)	HN2 (0.02mg/mL)	UVC		Trenimon (0.2mg/mL)	8MOP+UVA		MMs (0.01%)
			50J	100J		0.5kJ	1.0kJ	
BY4742 (WT)	S	S	S	S	S	S	S	S
BY <i>pso2Δ</i>	HR	SSSS	SS	SSS	SSS	SSS	SSSS	SS
Y11908 ( <i>yhr080cΔ</i> )	HR	S	S	S	S	S	S	S
Y11339 ( <i>yjl084cΔ</i> )	S	S	S	S	S	S	S	S

S a SSSS: cada S corresponde a um fator de sensibilidade de 10 quando comparada com a linhagem selvagem. HR indica hiperresistência. As culturas foram tratadas conforme descrito no capítulo 3, serialmente diluídas, plaqueadas em meio sólido sintético completo e incubadas por dois dias a 30°C.