

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Centro de Biotecnologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Estudo das funções da proteína Kin3 de *Saccharomyces cerevisiae* na resposta a danos no DNA**

**Tese de doutorado**

**Dinara Jaqueline Moura**

**Porto Alegre, julho de 2010.**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Centro de Biotecnologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Estudo das funções da proteína Kin3 de *Saccharomyces cerevisiae* na resposta a danos no DNA**

**Dinara Jaqueline Moura**

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

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jenifer Saffi**  
**Co-orientador: Prof. Dr. Guido Lenz**

**Porto Alegre, julho de 2010.**

Este trabalho foi desenvolvido nas instalações do Laboratório de Radiobiologia Molecular do Departamento de Biofísica desta Universidade com financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- Projeto número 477391/2007-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Fundação de Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*“A sabedoria da vida não está em fazer aquilo que se gosta,  
mas em gostar daquilo que se faz”.*  
*Leonardo da Vinci*

*“É bom olhar pra trás e admirar a vida que soubemos fazer  
É bom olhar pra frente, é bom nunca é igual  
Olhar, ouvir e cantar um novo dia nascendo  
É bom e é tão diferente”*  
*Nando Reis*

## AGRADECIMENTOS

A Jenifer, pela confiança, pelas oportunidades, pelos conhecimentos compartilhados, pelo aprendizado da importância do estabelecimento de vínculos com outros pesquisadores (as famosas colaborações), pelas noções tão fundamentais de autoconfiança, pelos papos informais sobre a vida, pela amizade, pela alegria contagiante (quase sempre) e acima de tudo pela sua forma de orientação, que me proporcionou liberdade (muito bem assistida) para condução do meu trabalho e amadurecimento científico ao longo desses anos. Com certeza todas as coisas que aprendi contigo, científicas ou não, serão fundamentais para minha vida. Minha admiração e gratidão são imensas.

Ao professor Guido, que introduziu as Neks em nossas vidas, pela acolhida, pela valiosíssima orientação, pelas várias discussões científicas, pelos conselhos, enfim por tudo. Sempre cheio de idéias (muitas) e sugestões, um pesquisador que com certeza serve de exemplo para que corramos atrás dos nossos ideais científicos.

Ao professor Henriques, meu co-orientador informal, pelo apoio científico e financeiro, necessários para a construção dos trabalhos apresentados nesta tese. Agradeço ainda, a confiança, as oportunidades, a todas as discussões científicas e a amizade ao longo desses anos. Respeito e admiro muito a forma como coordena e conduz o “grande e misto” grupo científico do qual fazemos parte.

Ao professor Diego Bonatto, que numa tarde de sol em dezembro de 2005, durante uma crise de “e agora que projeto farei?”, me sugeriu buscar órtologos da proteína Nek1 em leveduras e pensar num projeto relacionado a isso, me ajudando a encontrar a Kin3. Agradeço também, pela ajuda como membro da minha Comissão de acompanhamento, pelas pertinentes sugestões e valiosas discussões durante a execução do projeto.

A Professora Fabiana Horn, membro da minha Comissão de Acompanhamento, pelas críticas e sugestões sobre a condução do trabalho durante estes quatro anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, em especial aos professores dos quais fui aluna, pela excelente formação.

A Silvia Centeno e Luciano Saucedo, do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pela amizade, disponibilidade e vários momentos divertidos.

A Bruna Castilhos e Bruna Immich, “as Brunas”, minhas queridas estudantes de Iniciação Científica, fundamentais para execução deste trabalho, por toda ajuda, pelos momentos divertidos, pelos conhecimentos que compartilhamos, pela disponibilidade, pela compreensão nos momentos difíceis e apoio nas etapas “de tranca experimentos”. Sem vocês teria sido muito mais difícil.

A Ana Catarina, que me acompanhou nos primeiros passos deste trabalho, sempre muito dedicada e empenhada na realização de suas tarefas.

A Jaqueline Rocha, minha amiga e agora comadre, por ter topado entrar neste projeto de forma tão fundamental, pela ajuda e pelos muitos momentos alegres e divertidos que compartilhamos no laboratório, e que agora se estendem para fora dele.

A Jacqueline Cardone, pela ajuda com as “novas metodologias” e as várias dicas moleculares, especialmente nos experimentos de duplo híbrido, sempre disponível e muito querida.

Ao Andrés Cañedo, que durante meses me ajudou a fazer as avaliações de ciclo celular, pelo empenho, persistência e momentos de leitura no citômetro *muy informativos y entretenidos*.

As minhas amigas Albanin, Diana e Valéria, pela amizade, paciência, tolerância (sei que não sou fácil), pela troca de anseios e experiências, pelas discussões científicas, pelas “situadas” tão necessárias, pelos momentos divertidíssimos no laboratório (e especialmente, os fora dele), enfim por tornarem o ambiente de pesquisa bem mais agradável e a minha vida mais divertida. Adoro muito cada uma de vocês.

Ao Angelo, membro chefe da comunidade “me ajuda que eu te ajudo”, pelas inúmeras quebradas de galho nesse período, pelos cafezinhos e tiradas muito divertidas. Acredito que um dia ganhará na mega-sena, com certeza!

A Alessandra Pelegrini, minha (ex) companheira de futebol, pelo compartilhamento dos anseios, dúvidas e conhecimentos científicos sobre as Neks e outras coisinhas a mais.

A Nusha, pela ajuda com o inglês dos trabalhos, pela preocupação e interesse constante no nosso bem estar, e por todos os *helps* diários.

As meninas do Genotox, em especial a Mirian, Izabel, Miriana, Márcia e Jaque Silveira, pela amizade, suporte nos momentos de crise, conselhos pertinentes, as trocas de informações científicas, os vários amigos secretos e pelos ótimos momentos de convívio dentro e fora do laboratório.

Ao meu amigo de sempre Renato Rosa pela solícita ajuda sempre necessária, por todos os conselhos, pelos desabafos, enfim por todos os momentos alegres e divertidos compartilhados dentro e fora do laboratório durante todos estes anos.

A todos os colegas ou associados do grupo de pesquisa, que aqui estão ou que passaram, ao longo destes anos, em especial, a Larissa, Iuri, Gabrielle Salton, Micheli, Ana Arigony, Cristiano, Renata, Fabrício, Valéria Flores Péres, André e Tatiana, pelas discussões científicas e conversas informais. Em especial a Fernanda Munari, pelos ensinamentos e dicas sobre a arte do *immunoblotting*.

Aos funcionários e professores do Departamento de Biofísica, em especial a Iranez, Prof<sup>a</sup>. Ana Lígia, Dona Zelma, Jussara, D. Helena, Rosane, Fabiano, Prof. Eduardo Diaz, Prof<sup>a</sup>. Angélica e Prof<sup>a</sup>. Kátia, pelo carinho, atenção e por tornarem tão agradável e divertido o nosso dia a dia. Tem coisas que só acontecem na biofísica!

Aos colegas do PPGBCM, pelo convívio, trocas de informações (de reagentes também) e empréstimos de equipamentos. Em especial aos alunos dos grupos de pesquisa coordenados pelos professores Guido Lenz, Augusto Schrank e Fabiana Horn.

As minhas amigas de hoje e sempre, Tatiana, Isabel, Preta, Vivian e Daniela, pelos momentos de lazer *out* pesquisa. É sempre muito bom conviver com vocês, nem que seja um pouquinho.

A minha família, em especial aos meus irmãos Sandra, Mário, Guto, Paulo, Déia e Daia, pelo apoio incondicional, pelo estímulo, pela amizade, pelo amor, pelo carinho, pelos conselhos e especialmente pela compreensão. É muito bom fazer parte de uma família bacana como a nossa, amo muito cada um de vocês.

Aos meus pais, as pessoas mais tudo de bom que existem no mundo, exemplos de amor, persistência, luta, equilíbrio, bondade e generosidade, agradeço pelo apoio incondicional necessário ao longo desta jornada. Vocês são o máximo, amo vocês.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS _____	10
RESUMO _____	12
ABSTRACT _____	14
INTRODUÇÃO _____	16
1. Introdução Geral _____	17
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> _____	19
1.2. Ciclo Celular e pontos de checagem _____	20
1.3. Processos de reparação de danos no DNA _____	30
1.4. Formação de adutos _____	34
1.5. Reparação de adutos _____	37
1.6. Um pouco mais sobre o complexo MRX _____	40
1.7. Regulação da Reparação de DNA através do ciclo celular _____	43
1.8. Proteína NIMA _____	46
1.8.1. Proteínas relacionadas a NIMA em mamíferos _____	49
1.8.2. Proteína Kin3 _____	51
OBJETIVOS _____	55
1. Objetivo Geral _____	56
1.1 Objetivos específicos _____	56
CAPÍTULO I _____	58
Kin3 protein, a NIMA-related kinase of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , is involved in	
DNA adduct damage response _____	59
CAPÍTULO II _____	69



---

The NIMA-related kinase Kin3p interacts with the MRX complex in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	70
DISCUSSÃO GERAL .....	102
CONCLUSÕES .....	113
PERSPECTIVAS .....	116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	119
ANEXOS .....	132
Anexo I .....	133
Anexo II .....	134
CURRICULUM VITAE .....	135

**LISTA DE ABREVIATURAS**

8-MOP	8-metoxipsoraleno
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated protein</i> (proteína ataxia-telangiectasia mutado)
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3 related protein</i> (proteína relacionada a ataxia-telangiectasia e Rad3)
BER	<i>base excision repair</i> (reparação por excisão de bases)
BRCT	<i>BRCA1 C-terminus domain</i> (domínio BRCA1 C-terminal)
Cdc	<i>cell division cycle protein</i> (proteína de divisão celular)
Cdk	<i>cyclin-dependent kinase</i> (cinases dependentes de ciclina)
CKI	<i>Cdk inhibitor proteins</i> (proteínas inibidoras de Cdk)
Chk	<i>checkpoin kinase</i> (cinase de checagem de ciclo celular)
Ddc	<i>DNA damage checkpoint protein</i> (proteína de checagem de ciclo celular de dano no DNA)
DDR	<i>DNA damage response</i> (resposta a danos no DNA)
DSB	<i>double strand breaks</i> (quebras dupla no DNA)
ERO	espécies reativas de oxigênio
FHA	<i>forkhead-associated domain</i> (domínio associado a <i>forkhead</i> )
GG-NER	<i>global genome NER</i> (NER de genoma global)
HN2	mustarda nitrogenada
HR	<i>homologous recombination</i> (recombinação homóloga)
ICL	<i>interstrand cross-links</i> (pontes intercadeias)
Kin3	<i>protein kinase 3</i> (proteína cinase 3)
Mec	<i>mitosis entry checkpoint kinase</i> (cinase de checkpoint entrada na mitose)

---

MMR	<i>mismatch repair</i> (reparação de erros de emparelhamento de bases)
MMS	metilmetano sulfonato
Mre11	<i>meiotic recombination 11 protein</i> (proteína de recombinação meiótica 11)
MRX	complexo formado pelas proteínas Mre11, Rad50 e Xrs2
NER	nucleotide excision repair (reparação por excisão de nucleotídeos)
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i> (recombinação não homóloga)
NIMA	<i>never in mitosis A</i>
Nrk ou Nek	<i>NIMA related kinase</i> (cinases relacionadas a NIMA)
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i> (proteína antígeno nuclear de proliferação celular)
PIKK	<i>phosphatidylinositol 3-kinase-like protein kinases</i> (proteínas cinases semelhantes à fosfatidilinositol 3-cinase)
PKD	<i>polycystic kidney disease</i> (doença policística do rim)
Rad	<i>radiation sensitive protein</i> (proteína sensível a radiação)
RFC	<i>Replication factor C</i> (fator de replicação C)
ssDNA	<i>single strand DNA</i> (DNA simples fita)
TC-NER	<i>transcription coupled NER</i> (NER acoplado a transcrição)
Tel1	<i>telomere maintenance kinase 1</i> (cinase de manutenção de telômero 1)
TLS	<i>translesion synthesis</i> (síntese translesão)
Xrs2	<i>X-ray sensitive 2 protein</i> (proteína sensível a raio X 2)

## RESUMO

A resposta de células eucarióticas após exposição a estresse genotóxico é a ativação de uma intrincada rede de sensores, transdutores e efetores envolvidos em vias de reparação de DNA e controle de ciclo celular. Para garantir a fidelidade dessas vias regulatórias, existem mecanismos celulares evolutivamente conservados, chamados pontos de checagem, que monitoram a estrutura dos cromossomos, coordenando reparação de DNA e progressão do ciclo celular, controlando a capacidade da célula em parar o ciclo celular como resposta a danos no DNA, concedendo tempo para que ocorra a reparação. Os processos de reparação de danos no DNA são bem estabelecidos, porém, a sinalização para ativação de parada de ciclo celular na resposta a estas lesões é menos conhecida.

A proteína Kin3 é uma serina treonina cinase de *Saccharomyces cerevisiae* estruturalmente relacionada à NIMA, um regulador mitótico descrito inicialmente no fungo *Aspergillus nidulans*, o qual está envolvido na regulação da progressão da fase G<sub>2</sub>/M e na organização de alguns eventos mitóticos. Como a maioria dos reguladores de ciclo celular é conservada, neste trabalho avaliou-se a função de Kin3p na resposta a danos no DNA. Nossos resultados demonstram que a deleção do gene *KIN3* induz sensibilidade a cisplatina, doxorubicina, mustarda nitrogenada e MMS. Além disso, o mutante *kin3Δ* não apresenta uma parada de ciclo celular eficiente no ponto de checagem G<sub>2</sub>/M e uma diminuição da reparação das quebras no DNA após estes tratamentos, sugerindo que Kin3p possa estar envolvida no reconhecimento ou sinalização destas quebras. A expressão do gene *KIN3* em resposta a estresse genotóxico está aumentada, assim como há um aumento da expressão da proteína codificada por este gene. O co-tratamento com cafeína, um inibidor das proteínas de sinalização de danos no DNA Mec1 e Tel1, induz um aumento da

sensibilidade aos agentes genotóxicos no mutante *kin3* e diminui a expressão do gene *KIN3* na linhagem selvagem, sugerindo que a proteína Kin3 possa atuar em uma via de sinalização dependente de Mec1p/Tel1p.

Na busca por esclarecimentos a respeito da via de atuação da proteína Kin3, avaliou-se a interação da mesma com as proteínas do complexo Mre11p/Rad50p/Xrs2p, já que previamente Mre11p tinha sido apontada como parceira molecular da proteína relacionada a NIMA de humanos Nek1. Nossos resultados de interação *in vitro* utilizando o sistema duplo híbrido, demonstraram que a proteína Kin3 interage com cada uma das proteínas do complexo MRX. Esta interação foi confirmada pela epistasia entre os mutantes *kin3Δ* e *mre11Δ*, *rad50Δ* ou *xrs2Δ* em ensaios de sensibilidade a cisplatina, mustarda nitrogenada e 8-MOP foto-ativado. A expressão do gene *KIN3*, que como mencionada anteriormente está aumentada na resposta a estresse genotóxico na linhagem selvagem, também está aumentada nos mutantes do complexo MRX, demonstrando que a ativação do gene *KIN3* independe da formação do complexo MRX.

O conjunto de dados apresentados nesta tese demonstra, pela primeira vez, o envolvimento da proteína Kin3 na resposta a agentes indutores de adutos no DNA, em uma via dependente de Tel1p/Mec1p, através da interação com o complexo MRX. Embora, o progresso no entendimento dos mecanismos de detecção, sinalização e reparação de danos no DNA tem sido grande, muitos detalhes moleculares ainda esperam por respostas e o estudo de novas proteínas pode ser importante para o entendimento destas lacunas.

## ABSTRACT

The eukaryotic cells response to genotoxic stress is the activation of an intricate network of sensors, transducers and effectors involved in DNA repair pathways and cell cycle control. These regulatory pathways must be quite faithful. To reach this fidelity, there are cellular mechanisms evolutionarily conserved, called cell cycle checkpoints, which monitor the structure of chromosomes and coordinate DNA repair, cell cycle progression by controlling the cell's ability to stop the cell cycle in response to DNA damage, providing time for repair to occur. The DNA damage repair mechanisms are well established. However, the signaling for cell cycle arrest activation in response to these lesions is less well known.

Kin3 protein is a serine/threonine kinase of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* that is related to the NIMA (Never-In Mitosis, gene A) protein of *Aspergillus nidulans*, which is involved in the response to DNA damage, regulation of G<sub>2</sub>/M phase progression and is important for orderly mitotic events. Since the majority of cell cycle regulators are conserved throughout the eukaryotic domain, in this work we show that *KIN3* gene deficient cells present sensitivity and fail to arrest properly at G<sub>2</sub>/M-phase checkpoint in response to the DNA damage inducing agents MMS, cisplatin, doxorubicin and nitrogen mustard, suggesting that Kin3 can be involved in DNA strand breaks recognition or signaling. In addition, there is an increase in *KIN3* gene expression in response to the mutagenic treatment, which was confirmed by the increase of Kin3 protein. We also showed that co-treatment with caffeine, a Mec1 and Tel1 signaling DNA damage proteins inhibitor, induces a slight increase in the susceptibility to genotoxic agents in *kin3Δ* cells and abolishes *KIN3* gene expression in wild-type strain, suggesting that Kin3

protein can play a role in Tel1/Mec1-dependent pathway activation induced after genotoxic stress.

In search for understanding the Kin3 action mechanism in DNA damage response, we evaluated the interaction of this protein with each component of Mre11/Rad50/Xrs2 complex, since Mre11 had previously been identified as Nek1 (NIMA-related human protein) molecular partner. Taking into account that the phenotype of Kin3-deficient cells is rather similar to Nek1-deficient cells and that the MRX complex is highly conserved, we show that the Kin3 protein interacts with each protein of the MRX complex using a two-hybrid assay. These results were confirmed by the epistasis observed between *KIN3* and MRX in the sensitivity to cisplatin, nitrogen mustard and photo-activated 8-methoxypsoralen. The *KIN3* gene expression was upregulated in the wild type strain after mutagenic stress, in the same way, is also increased in MRX mutants demonstrated that *KIN3* gene activation is independent of MRX complex formation.

The data presented in this thesis demonstrate, for the first time, the involvement of Kin3 DNA adducts damage response in Tel1/Mec1 dependent pathway, by MRX complex interaction. Although progress in understanding the mechanisms of detection, signaling and repair of DNA damage has been increased, many molecular details are still waiting for answers and the study of new proteins may be important for the understanding of these gaps.



## INTRODUÇÃO



## 1. Introdução Geral

A manutenção da estabilidade genética é um aspecto fundamental da vida. Constantemente, as células estão expostas a uma série de insultos exógenos e endógenos que podem afetar o DNA, colocando em risco a estabilidade desta molécula. Estas lesões podem bloquear a replicação do genoma e a transcrição dos genes e, se não reparadas ou reparadas incorretamente, induzem mutações no genoma ameaçando a viabilidade dessas células (JACKSON & BARTEK, 2009). A maioria das células eucarióticas emprega uma porcentagem significativa do seu genoma para codificação de proteínas de sinalização de danos, reparação de DNA e tolerância a danos, que atuam em múltiplos complexos e vias inter-relacionadas, para minimizar os efeitos deletérios dos danos no DNA, visando à precisão da transmissão da informação genética ao longo das gerações, assim como o fluxo das informações DNA-proteína (LAMBERT *et al.*, 2007).

A presença de danos no DNA leva a ativação da maquinaria de reparação. Entretanto, se esta lesão não for rapidamente eliminada, ocorre uma parada temporária do ciclo celular, proporcionando maior tempo para que a reparação desses danos seja efetivada. Os sistemas de vigilância, chamados de pontos de checagem (*checkpoints*) de danos no DNA, são cascatas de transdução de sinais desencadeadas pela lesão e resultam na inibição da progressão do ciclo celular e replicação de DNA (LAZZARO *et al.*, 2009). Os danos no DNA podem ser bioquimicamente reparados por vias mecanisticamente distintas, espacial e temporalmente, conforme a natureza ou extensão da lesão (PUTNAM *et al.*, 2009). De acordo com o mecanismo de ação, três grandes vias são conhecidas atualmente: a reparação direta, a reparação por excisão e a reparação de quebras duplas (FRIEDBERG *et al.*, 2006). Existe ainda a possibilidade que um dano persista no genoma, sendo tolerado por mecanismos nos quais a maquinaria de replicação é capaz de utilizar o

DNA lesado como molde (síntese translesão) (SLUPPHAUG *et al.*, 2003; SCHMITT *et al.*, 2007). Quando a agressão no genoma é muito grande para ser solucionada por estas respostas, há uma possibilidade adicional de eliminação das células com danos através de mecanismos de apoptose e autofagia (NORBURY & ZHIVOTOVSKY, 2004; BURSCH *et al.*, 2008; HOEIJMAKERS, 2009). Dessa forma, as células integram os processos de reparação de DNA com a transcrição e morte celular programada, em uma rede que é conhecida como resposta a danos no DNA (*DNA damage response- DDR*), a qual é orquestrada por proteínas de pontos de checagem (JACKSON & BARTEK, 2009). Os processos celulares em resposta aos danos no DNA estão esquematizados na Figura 1.

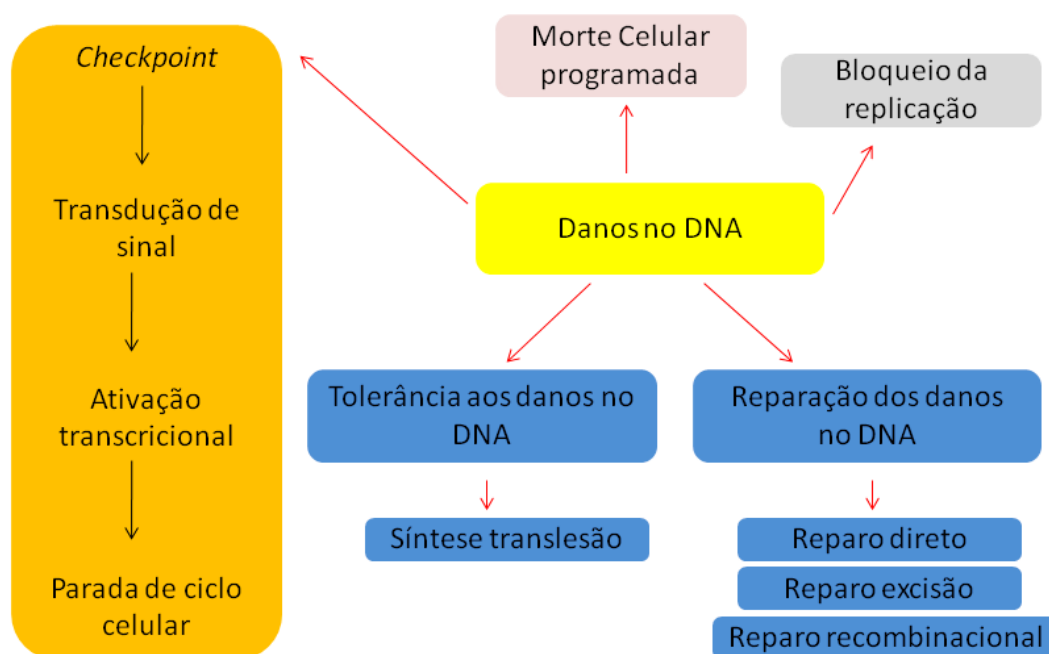


Figura 1. Respostas celulares aos danos no DNA. As respostas as lesões na molécula (em amarelo) podem resultar na tolerância ou reparação dos danos (em azul). O reparo dos danos no DNA representados por vias de reparação específicas. Estes eventos são modulados e facilitados pelos mecanismos de pontos de checagem (*checkpoints*) que induzem parada de progressão de ciclo celular em vários pontos (em laranja) e bloqueio da replicação (em cinza). De acordo com a extensão da lesão as vias de morte celular

programada (apoptose e morte celular autofágica) podem ser ativadas (em rosa). Adaptado de FRIEDBERG (2004).

Muito progresso tem sido feito na elucidação dos mecanismos das diferentes vias de reparação de DNA e sinalização destes danos, assim como na organização espaço-temporal desses processos. A maquinaria básica para manutenção do genoma e integridade celular é tão importante que muitos de seus mecanismos surgiram muito cedo e são conservados ao longo do processo evolutivo. Muitas proteínas são homólogas em forma e/ou função entre bactérias e células de mamíferos (HIETER *et al.*, 1998; PETRANOVIC & NIELSEN, 2008). As proteínas dos pontos de checagem de ciclo celular, por exemplo, são bem conservadas de leveduras a células humanas, indicando que a preservação destas se mantém ao longo da evolução (VENCLOVAS & THELEN, 2000; KAI & WANG, 2003).

### 1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido amplamente estudada, tornando-se ferramenta importante nas pesquisas sobre os mecanismos de sinalização e reparação de danos no DNA, assim como para entendimento de diversas outras funções biológicas, em razão da sua simplicidade e similaridade genética, bioquímica e funcional com células de mamíferos (HIETER, 1998; DOLINSKI & BOTSTEIN, 2005; OLIVER, 2006).

Algumas das propriedades que fazem da levedura particularmente apropriada para estudos biológicos incluem seu rápido crescimento e o fato de possuir um sistema genético bem definido. Ao contrário da maioria dos microrganismos, as linhagens da levedura *S. cerevisiae* são estáveis tanto em estado haploide quanto diploide, o que permite que

mutações recessivas sejam isoladas e manifestadas em linhagens haploides e, testes de complementação e segregação gênica possam ser estudados em linhagens diploides. A levedura possui um sistema de transformação de DNA altamente versátil, onde a integração de uma sequência de DNA procede majoritariamente via recombinação homóloga que, combinada ao alto grau de conversão gênica das leveduras, possibilitou o desenvolvimento de técnicas para substituição direta de sequências de DNA geneticamente modificadas, no lugar de sua cópia normal no cromossomo. Deste modo, genes intactos, mesmo aqueles dos quais não se conhecem mutações, podem ser convenientemente substituídos por alelos modificados. Estas técnicas têm sido extensivamente exploradas em análises que vão desde a regulação até relação estrutura-atividade de proteínas (SAMBROOK *et al.*, 1999; BURKE *et al.*, 2000).

Na levedura, os pontos de checagem de danos no DNA e de replicação são executados por um conjunto de genes, como dito anteriormente, com equivalentes estruturais ou funcionais em outras células eucarióticas. Entretanto, para compreensão dos pontos de checagem ao longo do ciclo celular, são necessárias algumas informações sobre o ciclo celular.

## **1.2. Ciclo celular e pontos de checagem**

As células se reproduzem mitoticamente pela duplicação de seus conteúdos e, então se dividem em duas. Este ciclo de divisão celular é a maneira fundamental pela qual todos os seres vivos são reproduzidos. A duração do ciclo celular varia de uma célula para outra e, é tradicionalmente dividido em fases distintas: i) fase  $G_1$  ( $G = gap$ ), intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA, que envolve crescimento da célula e preparo para a fase seguinte; ii) fase S (síntese), onde ocorre a replicação da molécula de

DNA; iii) fase  $G_2$ , intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose, com produção de moléculas necessárias para a divisão celular e; iv) fase M (mitose), onde ocorre a divisão nuclear seguida da citocinese. Adicionalmente, as células podem interromper seu crescimento durante o ciclo e passar para um estado de quiescência, frequentemente chamado de  $G_0$  (ALBERTS *et al.*, 2006). Uma vez estimuladas na presença de condições de crescimento necessárias, as células quiescentes deixam a fase  $G_0$  e entram na fase  $G_1$ , antes da síntese da molécula de DNA (fase S), seguido por uma segunda fase de *gap* ( $G_2$ ) e da divisão celular (mitose) (Figura 2).

O sistema controle de progressão do ciclo celular está baseado em três famílias de proteínas que são chave para o seu funcionamento. A primeira é a família das proteínas cinases dependentes de ciclina (Cdk), as quais induzem processos dependentes pela fosforilação de serinas e treoninas em proteínas selecionadas. A segunda família é composta por proteínas ativadoras especializadas chamadas de ciclinas, que se ligam as Cdk e controlam sua habilidade de fosforilar proteínas-alvo apropriadas. A terceira família é representada pelas proteínas inibidoras de Cdk (CKI), Sic1p em leveduras e p16, p17 e p21 em mamíferos, que atuam regulando os complexos ciclina-Cdk (ALBERTS *et al.*, 2006). Estes complexos CDKs-ciclinas são específicos em cada fase do ciclo celular. Enquanto, as células de levedura possuem apenas uma proteína Cdk, que se liga a todas as classes de ciclinas, em células de vertebrados existem quatro diferentes Cdk interagindo com as ciclinas (Figura 2).

Algumas características de ciclo celular, incluindo tempo para completar certos eventos, variam entre os organismos (e entre tipos celulares de um mesmo organismo). Contudo, a organização básica do ciclo é essencialmente a mesma em todas as células eucarióticas. Por exemplo, eucariotos superiores apresentam mais de uma Cdk (Figura 2),

porém, somente a Cdk1 parece ser essencial e, assim como em leveduras, na ausência das demais Cdk's, Cdk1 pode controlar todos os eventos durante a divisão celular (SANTAMARIA *et al.*, 2007).

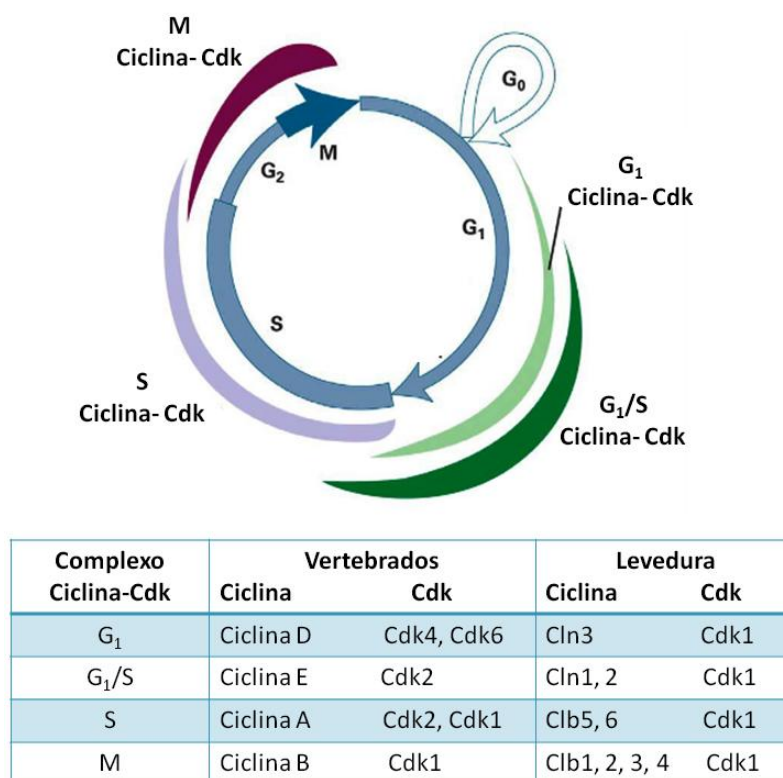


Figura 2. Esquema geral da regulação do ciclo celular eucariótico. A progressão do ciclo celular é controlada por complexos de cinases dependentes de ciclinas (Cdk) nas fases G<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>/S, S e Mitose (M). Estes complexos são formados pela subunidade ciclina regulatória e pela subunidade catalítica, representada pelas Cdk's. Os complexos ciclina-Cdk são específicos a cada etapa do ciclo celular e diferem entre os organismos, conforme mostrado na tabela. Adaptado de ALBERTS *et al.* (2006).

Os pontos de checagem operam durante todo o ciclo celular para manter a ordem e a fidelidade dos eventos do ciclo celular em resposta ao estresse replicativo e quebras no DNA, podendo diminuir a progressão do ciclo celular em qualquer fase (SCHMITT *et al.*, 2007). De maneira geral, os danos no DNA usualmente causam parada em G<sub>1</sub> para prevenir replicação de danos no DNA, parada em G<sub>2</sub>/M para prevenir segregação de

cromossomos com danos durante a mitose ou ainda a parada na fase S é ativada por insultos genéticos ou problemas na forquilha de replicação (ISHIKAWA *et al.*, 2006). As proteínas que atuam nestes pontos de checagem foram originalmente identificadas em resposta à exposição a agentes indutores de danos no DNA, já que a ausência de funcionalidade destas proteínas induz defeitos na progressão ou parada do ciclo celular. Defeitos nestes pontos de checagem prejudicam drasticamente a resistência das células a estresse genotóxico, assim como a bloqueios na forquilha de replicação, resultando em instabilidade genômica (BRANZEI & FOIANI, 2008).

A transmissão dos sinais ou ativação destes alvos, frequentemente, é realizada por diferentes eventos de fosforilação que afetam a expressão dos genes de reparação, modulam as transições de ciclo celular por influenciar a atividade ou estabilidade de outras proteínas que estão envolvidas na manutenção destes pontos de checagem ou na progressão do ciclo celular como as Cdks e ciclinas, por exemplo (BRANZEI & FOIANI, 2008). Além da fosforilação, outras modificações pós-traducionais como ubiquitinação e sumoilação de proteínas envolvidas nestes processos são essenciais para regulação da estabilidade e atividade de importantes componentes da maquinaria dos pontos de checagem, regulando os eventos do ciclo celular. Estas modificações podem afetar o recrutamento de proteínas de reparação ao local do dano no DNA ou dar eficiência e especificidade para maquinaria de reparação junto a certos tipos de lesão, facilitando, a reparação em uma fase específica do ciclo celular (BRANZEI & FOIANI, 2007; 2009).

A resposta aos danos no DNA exige rapidez e eficiência das proteínas sinalizadoras, além de sensibilidade para amplificar o estímulo inicial. As proteínas Mec1 e Tel1, pertencentes a uma cascata de transdução de sinal altamente conservada, apresentam estas características e, são fundamentais para a resposta celular a diversos tipos de danos

no DNA (ROUSE & JACKSON, 2002). Na levedura *S. cerevisiae*, as proteínas Tel1 e Mec1, homólogas das proteínas ATM (*Ataxia Telangiectasia-mutated*) e ATR (*ATM-related*) de mamíferos, respectivamente, são parte de um mecanismo sensor que detecta lesões de DNA e parada na forquilha de replicação, ativando cinases efetoras (D'AMOURS & JACKSON, 2002).

A reguladora central dessa via de sinalização em leveduras, Mec1p, pertence à família de proteínas cinases semelhantes à fosfatidilinositol 3-cinase (PIKKs - *phosphatidylinositol 3-kinase-like protein kinases*). Mec1p funciona de uma forma parcialmente redundante com Tel1p, outro membro da família PIKK (LISBY & ROTHSTEIN, 2009). Enquanto a proteína Tel1 parece estar envolvida principalmente na resposta a quebras dupla no DNA (DSB - *Double Strand Breaks*), a proteína Mec1, responde a uma ampla variedade de lesões e tem um papel particularmente importante na manutenção do genoma durante a replicação do DNA. Estudos demonstraram que a disrupção de ATR ou Mec1p causa letalidade celular. Por sua vez, ATM e Tel1p não são proteínas essenciais, embora defeitos na ATM induzam uma síndrome neurodegenerativa, com predisposição ao câncer, chamada de ataxia telangiectasia (AT) (revisado por ROUSE & JACKSON, 2002). Um terceiro componente da maquinaria central dos pontos de checagem, além de Mec1p/ATM e Tel1p/ATR, é a proteína DNA-PK. Esta cinase também é membro da família das PIKKs e responde a quebras duplas no DNA via interação com a proteína de recombinação não homóloga Ku80p (BRANZEI & FOIANI, 2008).

Várias proteínas são rapidamente fosforiladas por Mec1p/Tel1p na resposta a lesões no DNA. Entre estas proteínas estão as cinases efetoras Chk1 e Rad53 (Chk1 e Chk2, respectivamente, nos mamíferos) que, quando ativadas, fosforilam e modulam as principais proteínas de resposta a danos no DNA. Como Mec1p e ATR, as proteínas Rad53 de



levedura e Chk1 humana são essenciais (NEVANLINNA & BARTEK, 2006). A ativação de Rad53p e Chk1p pelas cinases Mec1p e Tel1p é dependente das proteínas Rad9 e Mrc1, que atuam como adaptadoras neste processo (Figura 3) (BRANZEI & FOIANI, 2006).

Mec1p, por exemplo, é independentemente recrutada nos sítios de danos, onde se liga ao DNA. Mec1p forma um complexo com Ddc2p, e pode atuar tanto no reconhecimento, quanto na transdução dos sinais, ativando alvos a jusante, como as proteínas Rad9, Rad53 e Chk1, com auxílio de pelo menos dois complexos formados por proteínas distintas (CARBALLO & CHA, 2007). O primeiro deles lembra o fator de replicação pentamérico (RFC), exceto pela proteína Rad24 (Rad17 em humanos). O RFC é um complexo formado por uma subunidade maior, Rfc1, e quatro subunidades menores, Rfc2-5, que adiciona a proteína antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA—*proliferating cell nuclear antigen*) ao redor das junções iniciador-molde de DNA, em um processo dependente de ATP (adenosina trifosfato) (ELLISON & STILLMAN, 2001). A proteína Rad24 apresenta similaridade de sequência com a proteína Rfc1 e interage com as subunidades menores de RFC (MAJKA & BURGERS, 2004; AROYA & KUPIEC, 2005). As proteínas do segundo complexo, Rad17, Ddc1 e Mec3 mostram similaridade de sequência com a PCNA. A PCNA é o fator de processividade das DNA polimerases, envolvido em síntese e reparação de DNA, com papel fundamental na determinação das consequências do encontro do dano pela forquilha de replicação (HÜBSCHER, 2009; GALLEGO-SÁNCHEZ *et al.*, 2010). As semelhanças dos complexos Rad17p/Ddc1p/Mec3p e Rad24p/Rfc2-5p com PCNA e RFC, geraram especulações sobre seu modo de ação e, de fato, o complexo Rad17p/Ddc1p/Mec3p é guiado ao DNA pelo complexo Rad24p/Rfc2-5p e, quando se desprende deste, percorre a molécula de DNA

desempenhando função de monitoramento (Figura 3) (BRANZEI & FOIANI, 2006; MAJKA *et al.*, 2006).

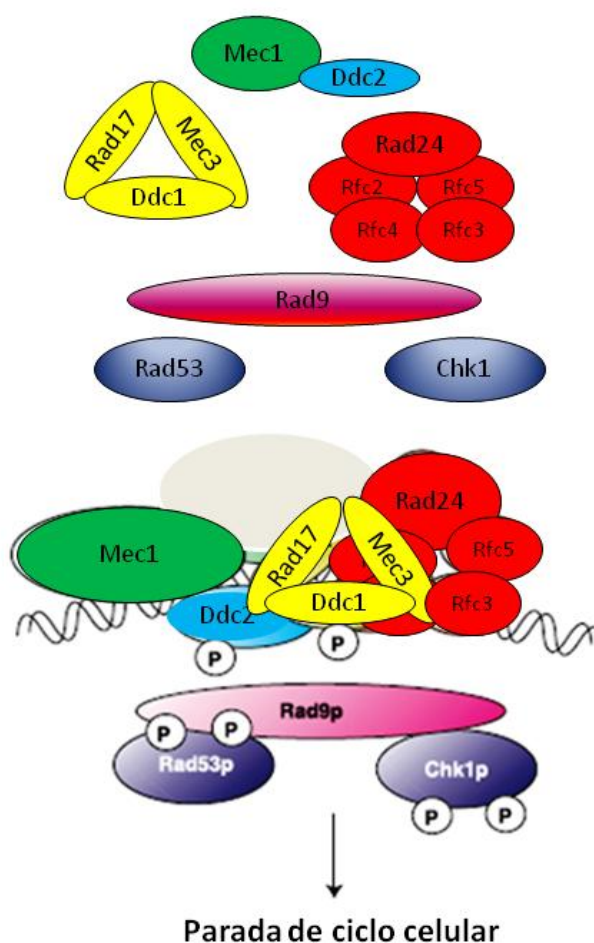


Figura 3. Ativação de parada de ciclo mediada pela via Mec1p. Após o reconhecimento dos danos no DNA, provavelmente por fatores específicos de reparação da lesão, Mec1p-Ddc2p se deslocam para sítios de danos independentemente dos complexos RFC-*like* (Rad24p/Rfc2-5p) e PCNA-*like* (Rad17p-Ddc1p-Mec3p). Da mesma forma, os dois complexos, RFC-*like* e PCNA-*like*, são direcionados para estes sítios, independentemente de Mec1p. Exatamente como estes complexos são direcionados para as lesões do DNA e a natureza exata das estruturas que eles reconhecem ainda são pouco conhecidos. A ativação de Rad53p e Chk1p, mediada pela proteína Rad9, acontece depois da formação dessa estrutura com a consequente parada de ciclo celular. Modificado de ROUSE & JACKSON (2002).

A proteína ATM tem papel fundamental na resposta a DSBs em células humanas. Contudo, a homóloga Tel1p de *S. cerevisiae* tem um papel secundário na resposta a danos no DNA. Tel1p responde a DSB não processadas, controlando o ponto de checagem, entretanto, este processo se torna aparente somente na ausência de Mec1p e converge para uma via comum a de Mec1p, ativando as cinases efetoras Chk1 e Rad53 (LISBY *et al.*, 2004). O complexo trimérico, conhecido como MRN (Mre11p/Rad50p/Nbs1p) em humanos e MRX (Mre11p/Rad50p/Xrs2p) em levedura, é substrato para as cinases ATM e Tel1p, respectivamente (GRENON *et al.*, 2001; D'AMOURS & JACKSON, 2002). Como apresentado na Figura 4, em resposta a formação de quebras duplas, o complexo MRX é rapidamente recrutado aos sítios de dano, interagindo com Tel1p. A proteína Mre11 é o primeiro fator a detectar os sítios de DSBs. Essa interação induz a auto-ativação de Tel1p, que atua então fosforilando as proteínas Mre11 e Xrs2 (D'AMOURS & JACKSON, 2002; LISBY *et al.*, 2004). Mec1p também parece interagir com o complexo MRX na resposta a quebras duplas, em uma resposta que parece ser independente de Tel1p (GRENON *et al.*, 2006).

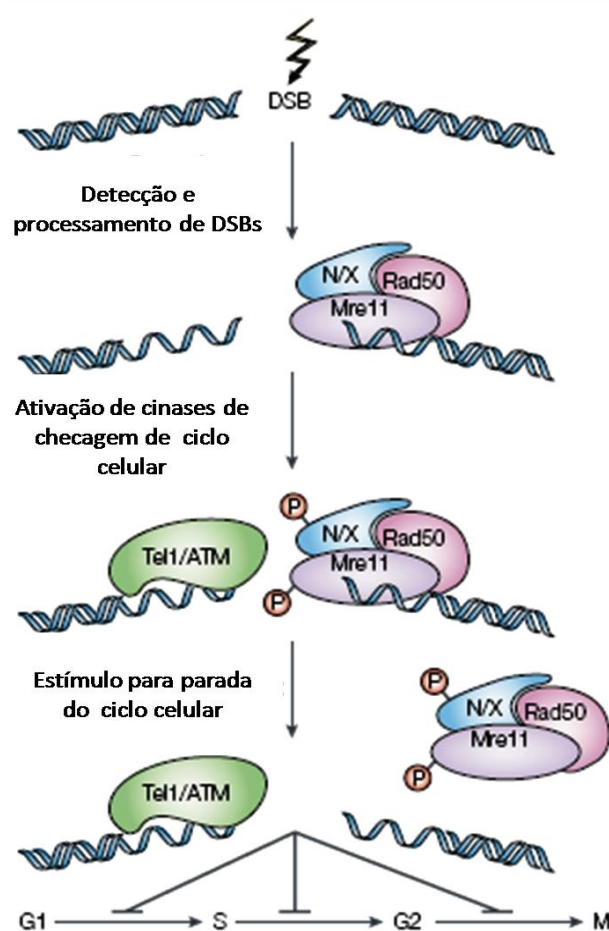


Figura 4. Modelo de função para o complexo MRX na sinalização de danos no DNA. Quebras duplas no DNA (DSBs) apresentam um fraco potencial para ativar pontos de checagem de ciclo celular. Entretanto, uma vez que o complexo MRX tenha detectado estas DSBs, a atividade exonucleásica deste complexo pode gerar regiões de DNA simples fita que são potentes indutores de ativação de pontos de checagem. Estas regiões podem, por exemplo, estimular cinases como a Tel1p, resultando em amplificação da sinalização de dano no DNA. Tel1p pode, então, fosforilar as proteínas Mre11 e Xrs2, que podem regular sua atividade. Modificado de D'AMOURS & JACKSON (2002).

A cascata de sinalização celular que regula especificamente a parada de ciclo celular é somente parte da maquinária que reconhece e responde aos danos no DNA e que, como descrito acima, são redes complexas. Na Tabela 1 estão listadas as principais

proteínas de sinalização celular de resposta a danos no DNA em *S. cerevisiae* e as suas homólogas em mamíferos, baseado na similaridade funcional e/ou de sequência.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mamíferos	Função
Mre11/Rad50/Xrs2 Rpa1	Mre11/Rad50/Nbs1 Rpa1	Sensor
Mec1/Ddc2 Tel1	ATR/ATRIP ATM	Sensor/Transdutor
Rad24/Rfc Ddc1/Mec3/Rad17	Rad17/Rfc Rad9/Hus1/Rad1	Sensor
Rad9 Mrc1	Mdc1/53BP1 Claspina BRCA1/Bard1 Rnf8 Rap80/Abraxas/BRCC36	Adaptador/ Transdutor
Chk1 Rad53	Chk1 Chk2	Efetor

Tabela 1. Proteínas de checagem de ciclo celular e a função relacionada. Estão listadas as proteínas de *S. cerevisiae* e os homólogos em células de mamíferos. Adaptado de NAVADGI-PATIL & BURGERS (2009).

As proteínas de checagem de ciclo celular são frequentemente recrutadas aos locais de lesão no DNA por complexos de reparação que geram estruturas intermediárias de DNA, que funcionam como sinais para ativar estas respostas de checagem. Por exemplo, fatores do processo de reparação por excisão de nucleotídeos (NER) são requeridos para processar lesões induzidas por radiações ultravioleta na levedura *S. cerevisiae* na fase G<sub>1</sub> do ciclo celular. Seguida da ativação, os efetores dos pontos de checagem (Rad53p e Chk1p, em *S. cerevisiae*) transmitem e amplificam estes sinais para alvos a jusante, como o restante do aparato de reparação de DNA e a maquinaria de ciclo celular (ASHWELL & ZABLUDOFF, 2008).

### 1.3. Processos de reparação de danos no DNA

Reparação de DNA é o termo bioquímico que define os processos biológicos de remoção das alterações químicas na molécula de DNA e o re-estabelecimento da integridade do genoma, abrangendo a totalidade das múltiplas e diversas vias que as células vivas fazem uso para responder aos danos no DNA (FRIEDBERG, 2008). Existe uma sobreposição funcional entre as diferentes vias de reparação de DNA, de forma que vários complexos atuam ao mesmo tempo na reparação de diferentes tipos de danos (LINDAHL & WOOD, 1999; SLUPPHAUG *et al.*, 2003). Esta diversidade de vias de reparação de DNA pode ser observada quando as mesmas são comparadas entre si. Por exemplo, algumas vias são usadas para reparar apenas um tipo de lesão, enquanto outras são mais abrangentes em seus requerimentos enzimáticos. Da mesma forma, algumas vias de reparação são mecanisticamente simples, enquanto outras são complexas, envolvendo múltiplos passos enzimáticos atuando com diferentes complexos protéicos (EISEN & HANAWALT, 1999).

Como mencionado anteriormente, atualmente são conhecidas três grandes vias de reparação de DNA, agrupadas em função dos seus mecanismos de ação. A primeira delas é representada pelos processos de reparação direta, apresentando dois mecanismos principais: a fotorreativação, catalisada por enzimas pertencentes à família das fotoliasas/criptocromos, e a reversão de bases alquiladas, catalisadas pelas DNA metiltransferases (CHRISTMANN *et al.*, 2003). Os processos de reparação por excisão de nucleotídeos (NER - *nucleotide excision repair*), reparação por excisão de bases (BER - *base excision repair*) e reparação de erros de emparelhamento de bases (MMR - *mismatch repair*) fazem parte da segunda grande via de reparação de lesões no DNA, a via de excisão (HSIEH & YAMANE, 2008; ROBERTSON *et al.*, 2009; LIU *et al.* 2010). A

reparação recombinacional representa a terceira grande via e está envolvida na resposta às quebras na molécula de DNA. A reparação de quebras duplas possui dois mecanismos principais: a recombinação homóloga (HR - *homologous recombination*) e a recombinação não homóloga (NHEJ - *non-homologous end joining*), ambas com requerimentos enzimáticos únicos, podendo ter funções sobrepostas para manutenção da integridade cromossomal em eucariotos (PARDO *et al.*, 2009; SHRIVASTAV *et al.*, 2009). Os diferentes tipos de danos no DNA e processos de reparação de DNA estão sumarizados na Figura 5.

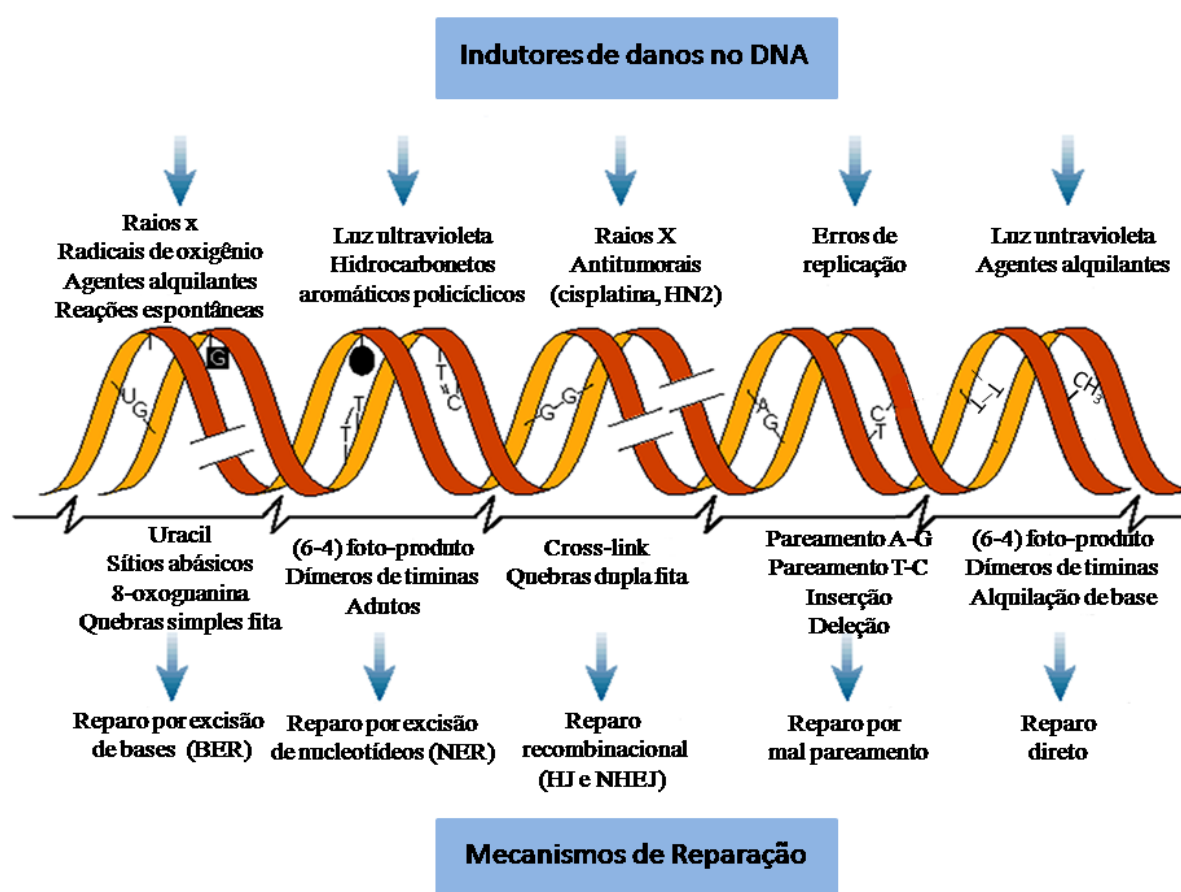


Figura 5. Danos no DNA e os mecanismos de reparo. Agentes que induzem danos no DNA (acima); exemplos de lesões induzidas por estes agentes (meio); e os mecanismos mais relevantes de reparação de DNA para remoção destas lesões (abaixo). Modificado de HOEIJMAKERS (2001).

Os danos no DNA são diversos e geralmente adversos, incluindo modificações químicas que ocorrem nas bases nitrogenadas (purina e pirimidinas), na desoxirribose e na ponte fosfodiéster. Entretanto, de todas essas modificações que podem ocorrer, as bases modificadas são as mais comuns (EVANS *et al.*, 2004). Os efeitos agudos resultam em distúrbios do metabolismo do DNA, provocando parada do ciclo celular ou morte celular. Os efeitos a longo prazo resultam em mutações irreversíveis que podem, em organismos multicelulares, contribuir para a oncogênese (HOEIJMAKERS, 2001).

Enquanto algumas lesões, como O-6-metilguanina, são sujeitas a uma reversão direta mediada por proteínas, à maioria das lesões são reparadas por uma sequência de eventos catalíticos mediados por múltiplas proteínas. Na reparação MMR, a detecção de erros de pareamentos, inserções ou deleções de bases induz uma incisão na fita simples que é substrato para nucleases, polimerases e DNA ligases (LI, 2008). Bases anormais, adutos de base simples, sítios abásicos e bases oxidadas (8-oxiguanina, por exemplo), reparadas pelo BER, são reconhecidas por enzimas glicosilases, que fazem a remoção da base lesada, seguida da ação de nucleases, polimerases e ligases que completam a reparação (BAUTE & DEPICKER, 2008; DALHUS *et al.*, 2009). O NER reconhece distorções na hélice como consequência de lesões nas bases que compõem a molécula, como as induzidas pela luz ultravioleta (dímeros de pirimidinas). Este sistema pode ser subdividido em duas sub-vias, que diferem no sistema de reconhecimento da lesão: NER acoplado a transcrição (TC-NER – *transcription coupled NER*), o qual reconhece especificamente lesões que bloqueiam a transcrição, e NER de genoma global (GG-NER – *global genome NER*). De maneira geral, no NER, 22-30 nucleotídeos são retirados produzindo DNA simples fita (ssDNA - *single strand DNA*) seguido da atuação de polimerases e fatores associados antes da ligação (JACKSON & BARTEK, 2009, LIU *et al.*, 2010). Tanto as vias de reparação direta quanto



a de excisão são essenciais para a remoção de bases modificadas e adutos, de forma que respondem por grande parte da atividade de reparação de DNA na célula (BOITEUX & GUILLET, 2004; DALHUS *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2009; VASQUEZ, 2010).

As quebras no DNA podem acontecer como consequência de ataque de um agente químico ou físico à ponte fosfodiéster ou de um bloqueio no processo de replicação ou ainda, da ação de enzimas específicas com funções de reparação e/ou que atuem no metabolismo geral do DNA (MURAKAMI *et al.*, 2009; NAHAS & GATTI, 2009). As lesões do tipo DSBs são consideradas as mais tóxicas para célula, pois quando não reparadas podem originar mutações e arranjos cromossômicos que podem ter como consequência a perda de cromossomos ou morte celular (DUDÁS & CHOVANEC, 2004). Os dois principais mecanismos, evolutivamente conservados em eucariotos, envolvidos na reparação de DSBs são o de recombinação não homóloga (NHEJ) e o de recombinação homóloga (HR). No NHEJ, as quebras duplas são reconhecidas pelas proteínas Ku que, então, se ligam ativando as proteínas DNA-PK, levando ao recrutamento e ativação de enzimas de processamento de extremidades, polimerases e DNA ligases. No HR, o processo de reparação de DSBs é sempre iniciado pela geração de DNA simples fita, o qual é promovido pela ação de várias proteínas incluindo o complexo MRX. Em eventos catalisados pela proteína Rad51, com auxílio das proteínas Rad54 e RPA, inicia-se a invasão da fita homóloga, seguida da ação de polimerases, nucleases, helicases e outros componentes e, por fim, a ligação e a resolução das junções de Holliday (SHRIVASTAV *et al.*, 2008).

Além dos mecanismos de reparação, existe o processo de tolerância a danos chamado síntese translesão (TLS - *translesion synthesis*), no qual o dano não é efetivamente reparado mas ocorre um desvio (*bypass*) das lesões, permitindo a conclusão

da replicação. Em eucariotos, as polimerases pertencentes à família Y e a DNA polimerase  $\zeta$  (pertencente à família B) são capazes de promover a replicação através de lesões no DNA. Ao contrário das polimerases replicativas que sintetizam DNA com um alto grau de precisão e são bloqueadas por lesões que distorcem significativamente a topologia do DNA, as polimerases da TLS são capazes de sintetizar através destas lesões, devido à presença de sítios ativos mais abertos que permitem acomodar estas lesões, porém apresentam uma taxa muito maior de erro que as polimerases replicativas (PRAKASH *et al.*, 2005; ANDERSEN *et al.*, 2008; GAME & CHERNIKOVA, 2009).

#### **1.4. Formação de adutos no DNA**

A formação de ligações covalentes entre determinadas classes de substâncias químicas e as bases nitrogenadas do DNA é conhecida como adutos (Sharer, 2005). Quimicamente, os compostos ou agentes formadores de adutos podem ser separados em mono- e bi-funcionais (BELJANSKI *et al.*, 2004). Os agentes monofuncionais induzem a formação de ligação covalente entre um composto químico e apenas uma base nitrogenada (adutos monofuncionais). Os agentes alquilantes, como o MMS (metilmetano sulfonato), são exemplos de substâncias capazes de gerar monoadutos, que podem ligar-se as bases do DNA através do grupamento metila (SANDERSON & SHIELD, 1996). Os agentes bifuncionais possuem a habilidade de se ligar covalentemente a duas bases nitrogenadas (adutos bifuncionais), estejam estas situadas na mesma fita de DNA (pontes intracadeia) ou em fitas separadas (pontes intercadeias – *interstrand cross-links* ou ICLs). Exemplos destes agentes são a cisplatina, mustardas nitrogenadas e psoralenos bifuncionais (SANDERSON & SHIELD, 1996; DRONKERT & KANAAR, 2001).

O agente monofuncional MMS induz metilação na posição N-7 de guanina (N7-MeG), na posição N-3 da adenina (N3-MeA) e na posição O-6 da guanina (O6-MeG), as quais compreendem 82 %, 11 % e 0,3 %, respectivamente, do total de lesões causadas (WYATT & PITTMAN, 2006). Em relação aos agentes bifuncionais, a cisplatina interage com o DNA formando adutos bifuncionais do tipo intracadeia e ICLs (5 a 8 % do total de adutos), ligando-se, preferencialmente, na posição N-7 de guaninas (FRANKENBERG-SCHWAGER *et al.*, 2005; TSANG *et al.*, 2009). As mustardas nitrogenadas bifuncionais atuam alquilando o DNA na posição N-7 da guanina ou na posição N-3 da adenina, formando em torno de 5 % de adutos do tipo ICL (McHUGH *et al.*, 1999; 2000). O 8-metoxi-psoraleno interage com o DNA em duas etapas, na primeira delas, intercala-se entre as bases pirimídicas sem formar ligações covalentes e, na segunda etapa, os adutos são formados por uma fotocicloadição entre a dupla ligação 4,5 do anel furano ou 3,4 do grupo cumarínico com a ligação 5,6 da timina. Um segundo fóton induz a formação de ICLs (MENIEL *et al.*, 1997; BRENDEL & HENRIQUES, 2001). Os agentes químicos e a interação destas substâncias com a molécula de DNA são apresentadas na Figura 6.

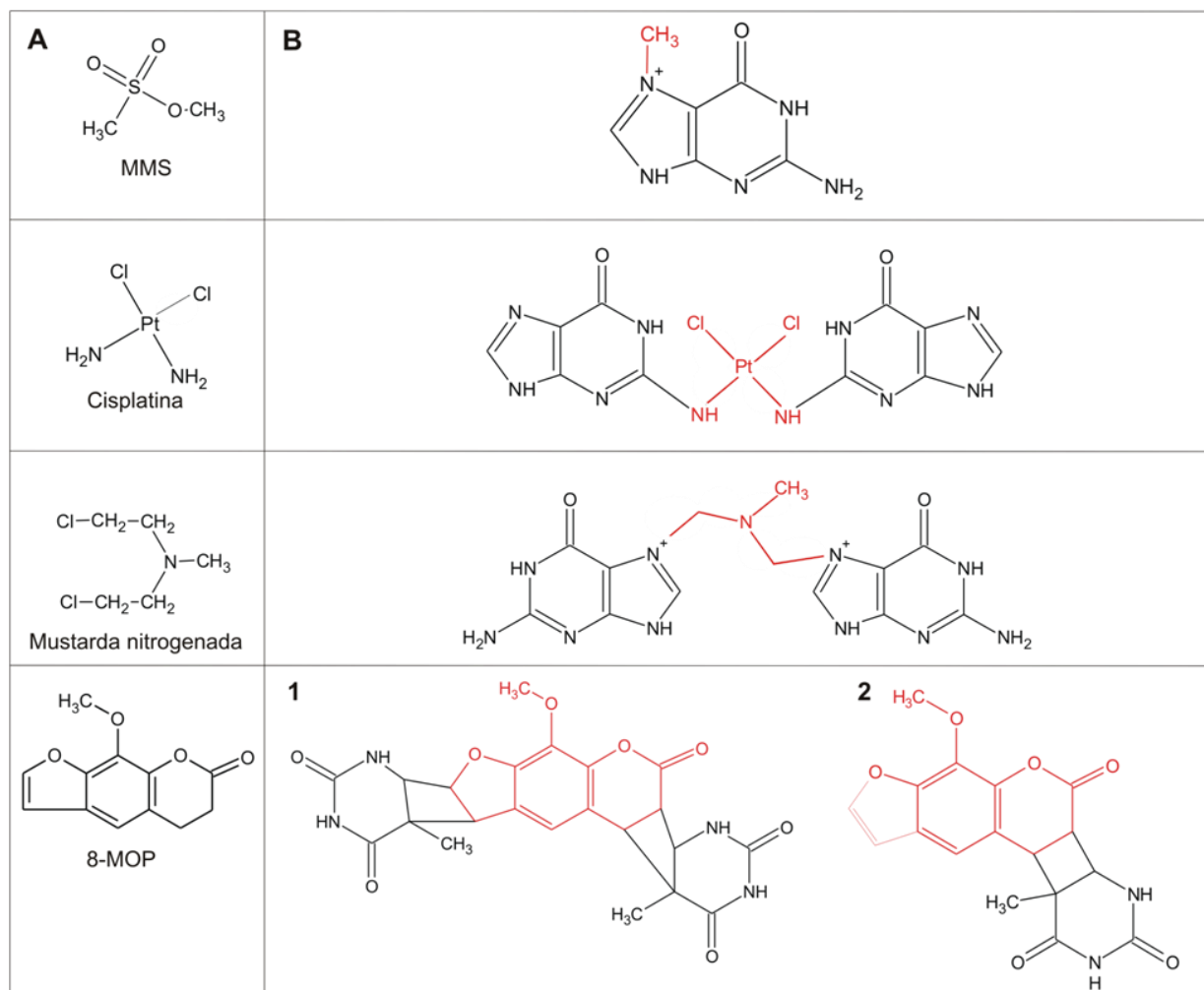


Figura 6. Exemplos de agentes mono- e bi-funcionais (A) e a interação destas moléculas (em vermelho) com o DNA (B). O 8-MOP pode induzir ICLs (1), assim como formar mono-adutos com o DNA (2).

Embora seu mecanismo de ação ainda não esteja completamente elucidado, a doxorubicina é outro agente que pode formar adutos covalentes com DNA. O mecanismo proposto para interação da doxorubicina com o DNA envolve a ligação covalente de maneira específica em sítios de G-C (GpC), mediada por uma ligação amina na presença de formaldeído entre a N-3 da droga com a N-2 da guanina (Figura 7). A fita complementar de DNA se liga através de pontes de hidrogênio a doxorubicina, estabilizando o aduto doxorubicina-DNA (SPENCER *et al.*, 2008). É importante ressaltar,

entretanto, que o principal mecanismo de citotoxicidade da doxorubicina envolve inibição de enzimas topoisomerase II (COLDWELL *et al.*, 2008).

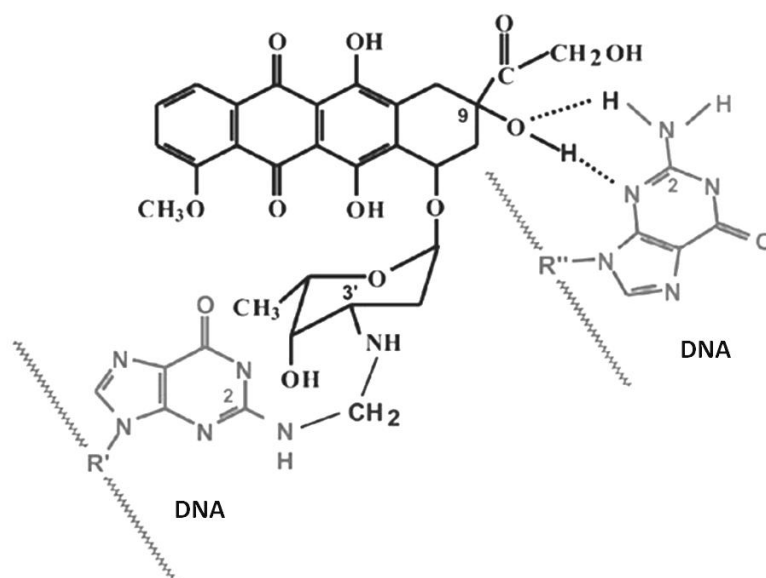


Figura 7. Interação entre doxorubicina e DNA. A estrutura da doxorubicina é mostrada em preto, enquanto as bases do DNA são mostradas em cinza. Uma interação covalente ocorre entre o N-3 da doxorubicina com a N-2 da guanina do DNA e uma interação não covalente, do tipo ponte de hidrogênio, entre a doxorubicina e uma segunda fita de DNA. Modificado de SPENCER *et al.* (2008).

### 1.5. Reparação de adutos

Depois da formação dos adutos no DNA, para realizar os processos metabólicos normais do DNA, como replicação e transcrição, as células devem ser capazes de remover ou tolerar estas lesões. Em leveduras, a reparação de ICLs é realizada de maneira coordenada por proteínas de várias vias, incluindo BER, NER, MMR, HR e TLS (VASQUEZ, 2010). O mecanismo de reconhecimento do ICL pode requerer parada da forquilha de replicação e/ou a ligação ao DNA de proteínas que reconhecem a distorção induzida pela ICL. Um passo inicial na reparação de DNA é a geração de incisões na

proximidade da ICL (HANADA *et al.*, 2006). Passos envolvendo a síntese translesão têm sido propostos, dependentes ou independentes dos processos de reparação (McHUGH & SARKAR, 2006). O colapso da forquilha da replicação na presença de ICLs pode gerar DSBs, incluindo, então, a participação da via recombinacional (NIEDERNHOFER *et al.*, 2004).

De maneira geral, o BER elimina os adutos de bases que provocam distorções relativamente menores no DNA (MEMISOGLU & SAMSON, 2000); o NER é uma importante via pela qual as células podem remover adutos volumosos no DNA que induzam distorções na hélice (FRIEDBERG *et al.*, 2006); a via MMR corrige os erros (inserções, deleções e/ou substituições de base) criados durante a replicação do DNA (HARFE & JINKS-ROBERTSON, 2000). Os processos de recombinação e TLS também oferecem rotas pelas quais as células podem continuar a duplicação do DNA, apesar da presença de adutos bloqueando a forquilha de replicação (DOETSCH *et al.*, 2001). Estas vias são consideradas de tolerância aos danos do DNA, pois permitem que as células possam concluir a replicação e mitose em detrimento do aumento de mutação e frequência de recombinação (BELJANSKI *et al.*, 2004). Estes percursos são resumidos na Figura 8.

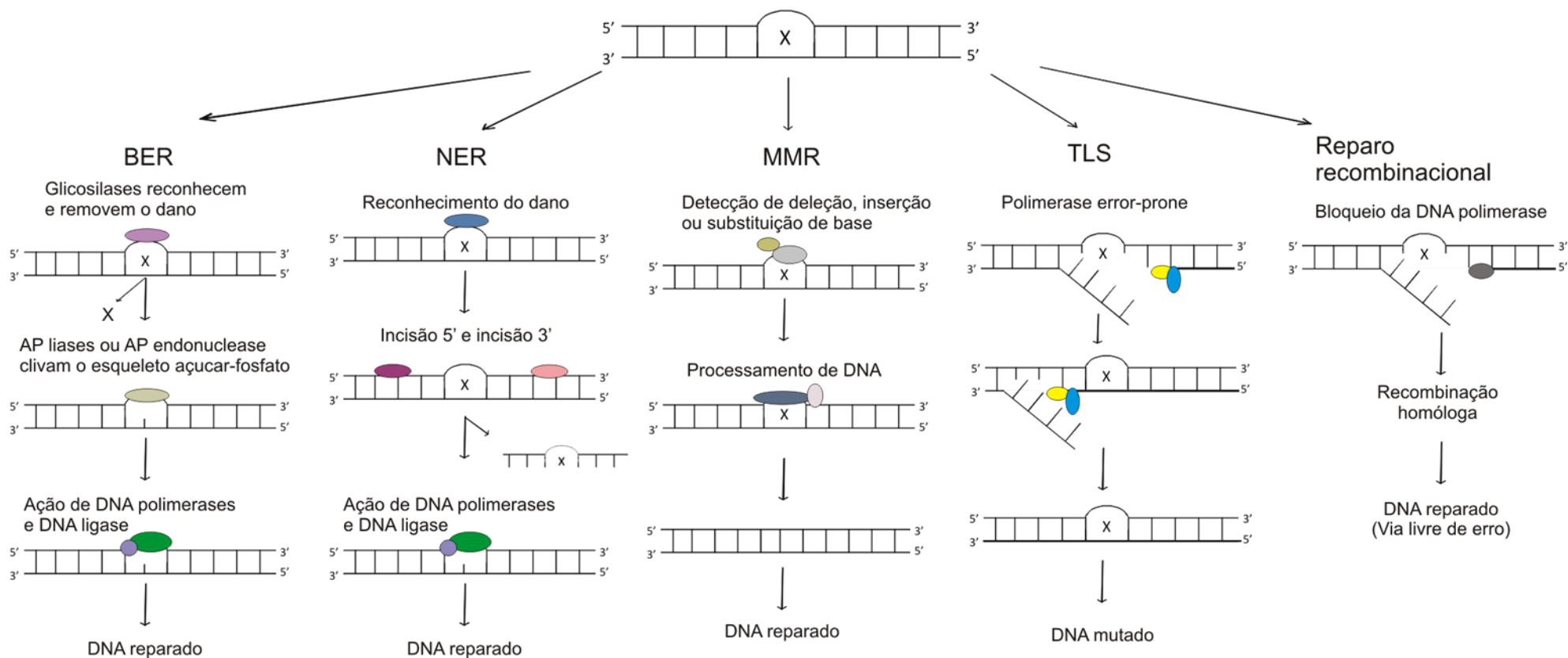


Figura 8. Principais vias para processamento de adutos no DNA em *S. cerevisiae*. O X representa os tipos de danos causados por agentes que induzem adutos no DNA e que são potencialmente processados por uma ou mais vias indicadas. Os processos de reparação indicados (BER, NER e MMR) resultam no re-estabelecimento da molécula de DNA ao estado original anterior ao dano enquanto TLS resulta em instabilidade genética e HR, embora seja uma via livre de erro, pode levar a um aumento da frequência de recombinação e, por isso, são considerados vias de tolerância ao dano. Adaptado de BELJANSKI *et al.* (2004).

## 1.6. Um pouco mais sobre o complexo MRX

Os genes *MRE11*, *RAD50* e *XRS2* foram identificados em triagens de mutantes de *S. cerevisiae* sensíveis à radiação ionizante e/ou defeituosos em recombinação meiótica (SYMINGTON, 2002). Atualmente, sabe-se que o complexo MRX é importante na manutenção da estabilidade genômica funcionando em vias de reparação de DNA, vias de recombinação genética, manutenção de telômeros e, como visto anteriormente na sinalização celular (TSUKAMOTO *et al.*, 2004; KROGH *et al.*, 2005; GHOSAL & MUNIYAPPA, 2007). As proteínas pertencentes a este complexo, Mre11, Rad50 e Xrs2, formam um complexo de alta afinidade com uma estequiometria de 2:2:1, respectivamente (CHAMANKHAH & XIAO, 1999).

Mre11p é o núcleo do complexo e interage independentemente com Rad50p e Xrs2p, além de interagir consigo mesmo formando dímeros e grandes multímeros (CHAMANKHAH & XIAO, 1999). Entre as propriedades biológicas da proteína Mre11 inclui-se: i) atividade exonucleásica 3' – 5' simples fita (ssDNA – *single strand DNA*) e dupla fita (dsDNA – *double strand DNA*); ii) atividade endonucleásica ssDNA; iii) dissociação de fitas de pequenos duplex de DNA, embora esta atividade seja limitada e iv) atividade de ligação a ssDNA e dsDNA (TSUKAMOTO *et al.*, 2005). As atividades nucleásicas e de ligação ao DNA são estimuladas pela presença de Rad50 (D'AMOURS & JACKSON, 2002). A proteína Rad50 possui habilidade de se ligar a dsDNA, em um processo dependente de ATP formando dímeros, que combinam com duas moléculas de Mre11p para formar um complexo tetramérico estável (TSUKAMOTO *et al.*, 2005). Esta ligação de Rad50p mantém as extremidades de DNA próximas, auxiliando no processo de reparação de quebras duplas (ANDERSON *et al.*, 2001).



Ainda, como mencionado acima, Rad50p possui a capacidade de estimular a atividade exonucleásica de Mre11p, enquanto regula negativamente a atividade endonucleásica, prevenindo a degradação excessiva do DNA (D'AMOURS & JACKSON, 2002; GHOSAL & MUNIYAPPA, 2007).

A proteína Xrs2, assim como a proteína Nbs1 de mamíferos, é o componente mais enigmático do complexo MRX, em função da divergência na sequência encontrada entre os homólogos nos diferentes organismos e da falta de funções bioquímicas claras. O domínio N-terminal conservado FHA (*forkhead-associated*) e o domínio BRCT, detectado recentemente, estão envolvidos na interação proteína-proteína, e esta interação parece ser regulada pela fosforilação dos parceiros moleculares (STEININGER *et al.*, 2008). Além de mediar interações proteína-proteína entre o complexo MRX e outras proteínas de sinalização e reparação de DNA, a proteína Xrs2 modula a atividade nucleásica do complexo Mre11p/Rad50p, e em função de sua capacidade de ligação à estruturas secundárias de DNA, ajuda a direcionar o dímero Mre11p/Rad50p até os locais de quebras duplas no DNA (D'AMOURS & JACKSON, 2002; TRUJILLO *et al.*, 2003).

Como visto na seção 1.2, o complexo MRX participa da sinalização de quebras duplas no DNA. Adicionalmente, este complexo tem funções na reparação destas lesões (LISBY *et al.*, 2004). Na reparação por recombinação homóloga, a proteína Mre11 está envolvida no início do processo fazendo a ressecção 3' – 5' das extremidades das DSBs para gerar extremidades 3' livres, enquanto a proteína Rad50, através da sua capacidade de ligação as extremidades do DNA, tem como função facilitar a busca de sequências homólogas na fita molde (Figura 9A) (D'AMOURS & JACKSON 2002; ASSENMACHER & HOPFNER, 2004). Na reparação não homóloga (NHEJ), embora o complexo possua função nucleásica, o

papel essencial parece ser estrutural, mantendo as extremidades das quebras unidas e recrutando o complexo ligase. Dessa forma, enquanto a proteína Rad50 ajuda a manter as extremidades das DSBs próximas, facilitando seu pareamento e ligação, a proteína Xrs2 interage com Lif1, estimulando a reação de ligação pelo complexo Lig4 (Figura 9B) (PARDO *et al.*, 2009).

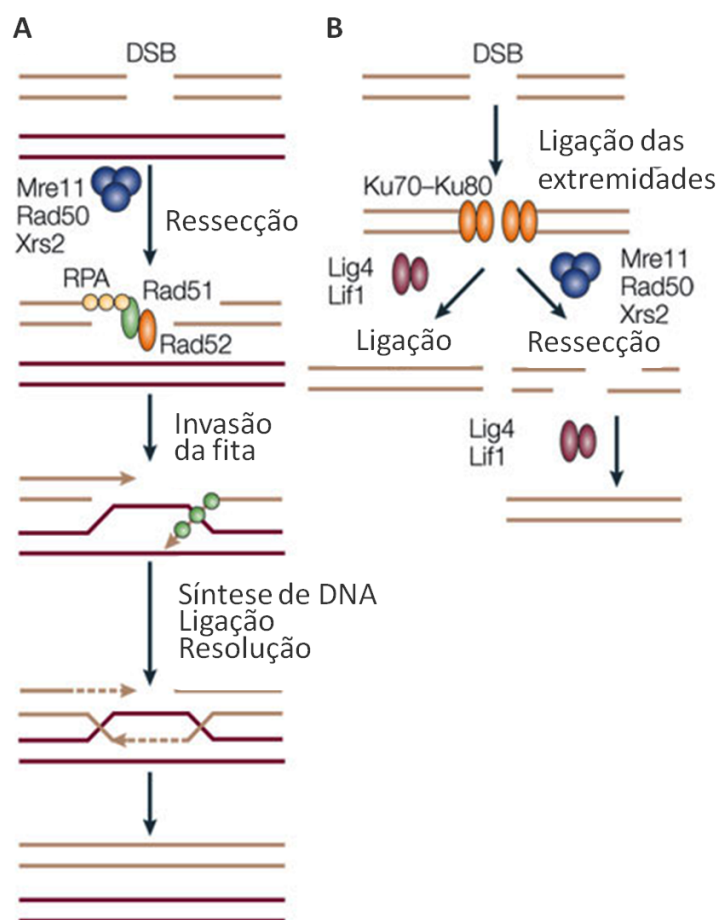


Figura 9. Participação do complexo MRX nos processos de reparação de quebras duplas via recombinação homóloga e recombinação não homóloga. No processo de recombinação homóloga (A), o complexo MRX participa do reconhecimento e processamento das extremidades geradas após as DSB. No processo de recombinação não homóloga (b) o complexo MRX parece envolvido na manutenção das extremidades DSB próximas interagindo com o complexo Lig4p/Lif1. Modificado de VAN ATTIKUM & GASSER (2005).

### 1.7. Regulação da reparação de DNA através do ciclo celular

Os cromossomos eucarióticos são replicados e segregados e, para isso, é necessário que sejam condensados e descondensados. Estes eventos ao longo do ciclo celular são acoplados a mudanças topológicas mediadas pelas topoisomerasas. A estrutura e a compactação da cromatina também são reguladas através do ciclo celular, e pode, ser influenciadas por pontos de checagem e outras modificações pós-traducionais. O processo de reparação de DNA que ocorre em resposta aos diversos estresses genotóxicos é indispensável para a manutenção da integridade genômica. As lesões no DNA ativam vias de pontos de checagem que regulam a especificidade dos mecanismos de reparação nas diferentes fases do ciclo celular.

As células em  $G_1$  necessitam reparar danos acidentais, como aqueles gerados por espécies reativas de oxigênio (ERO), agentes químicos, radiação ultravioleta ou radiação ionizante antes do começo da replicação, para que estas lesões não induzam uma parada da forquilha de replicação ou convertam estas lesões primárias em outros tipos de danos no DNA que podem resultar em consequências perigosas para célula. Por exemplo, a oxidação de guanina gera oxoguanina que é altamente mutagênica, pois pode parear com a adenina durante a replicação e causar uma transversão de G:C para T:A, uma das mutações mais comuns em cânceres humanos (JIRICNY, 2006). Como mencionado anteriormente, este tipo de lesão pode ser removido pelo BER. Outros mecanismos de reparação que ocorrem durante a fase  $G_1$  incluem NER e NHEJ. Entre outros, o NER está envolvido na reparação de ICLs durante a fase  $G_1$  em conjunto com polimerases de translesão (SANCAR *et al.*, 2004). As quebras que ocorrem quando a célula está em  $G_1$ , normalmente, são reparadas pela via de recombinação não homóloga, em função da alta compactação da cromatina e ausência de cromátides irmãs

(BRANZEI & FOIANI, 2008). Em resposta a danos no DNA na fase  $G_1$ , eucariotos superiores ativam uma via de checagem de ciclo celular dependente de ATM/ATR e Chk1p e Chk2p para inibir a atividade das proteínas Cdk. É importante lembrar que diferentes membros da família Cdk, em associação com diferentes ciclinas, regulam as transições ao longo do ciclo celular. A inibição de Cdk previne o recrutamento de Cdc45, um fator de replicação essencial, e de E2F, fator de transcrição necessário na fase S (BARTEK & LUKAS, 2001). Em leveduras, existe apenas uma Cdk, a qual se associa com diferentes ciclinas ao longo do ciclo celular. A Cdk1 não parece participar do checkpoint  $G_1/S$  e é inativada por fosforilação somente depois da entrada na fase S, tendo funções específicas na fase  $G_1$ . Outra diferença importante é que este ponto de checagem é mediado somente por Mec1p. A resposta a UVC e MMS envolve uma via de inibição do fator de transcrição Swi6p, o qual é responsável pela ativação de genes da fase S. Entretanto, embora Swi6p de levedura e E2F de mamíferos apresentem função análoga, não existe similaridade de sequência entre eles e o mecanismo de inibição executado por Swi6p é diferente do conduzido pelo E2F. Interessantemente, as células de levedura utilizam uma estratégia similar a de eucariotos superiores, inibindo o programa de transcrição requerido para entrada na fase S em resposta a danos no DNA na fase  $G_1$  (GRALLERT & BOYE, 2007).

Na fase S, além do estresse genotóxico, perturbações na forquilha de replicação podem levar a parada de ciclo celular. Os dados obtidos em levedura têm mostrado claramente que os pontos de checagem na fase S são mais significativos para evitar instabilidade genômica do que os das fases  $G_1$  e  $G_2/M$  (BARTEK *et al.*, 2004). Os pontos de checagem na fase S podem ser classificados em três tipos: i) intra S dependente de replicação; ii) intra S independente da replicação, o qual pode ser induzido por quebras duplas no DNA; iii) S-M dependente de

replicação. Estes pontos de checagem são mutuamente coordenados e compartilham alguns componentes, embora os efetores ainda não estejam totalmente definidos (para revisão BARTEK *et al.*, 2004). Componentes chaves dos pontos de checagem durante a replicação incluem a proteína de replicação A (RPA) e os complexos Mec1p/Ddc2p e Mec3p/Rad17p/Ddc1p. Os complexos sensores Mec1p/Ddc2p e Mec3p/Rad17p/Ddc1p reconhecem o dano de maneira independente e sua co-localização aumenta a ativação de Mec1p (MELO *et al.*, 2001). O sinal de danos no DNA é re-transmitido pelo mediador Rad9p, ou pelo mediador específico de estresse na replicação Mrc1p, as cinases efetoras Chk1 e Rad53. Durante a replicação as principais lesões que podem induzir parada de ciclo celular envolvem a formação de DNA simples fita ou de lacunas no DNA, que podem ser reparados por HR ou TLS, e ainda a formação de quebras duplas como resultado do colapso da forquilha de replicação, também reparadas por HR (BRANZEI & FOIANI, 2008).

O ponto de checagem G<sub>2</sub>/M é ativado na presença de lacunas e quebras duplas no DNA ocorridas durante a replicação como consequência do estresse genotóxico aumentado na fase G<sub>2</sub> ou ainda devido a perturbações do citoesqueleto (ANDREASSEN *et al.*, 2003). Assim como na parada de fase S, várias proteínas localizam-se no ponto de checagem G<sub>2</sub>/M, tais como Tel1, Mec1, Mec3, RPA, Ddc1, Ddc2, Rad9, Rad24, Mre11, além de Chk1 e Rad53 (ISHIKAWA *et al.*, 2006). Ressalta-se que Rad53p é requerida para resposta aos danos no DNA em todas as fases do ciclo celular e Chk1p contribui para ativação do ponto de checagem G<sub>2</sub>/M em uma maneira dependente de Rad53p.

A transição entre a fase G<sub>2</sub> e mitose está sob controle da proteína Cdk1, uma proteína altamente conservada em eucariotos. Esta proteína pode ser regulada de duas formas: i) através da ligação a ciclina B, já que a Cdk1 como monômero é inativa e ii) através de uma

série de reações de fosforilações e defosforilações reversíveis, especialmente catalisadas pela cinase Wee1 e pela fosfatase Cdc25, controlando a atividade da Cdk1/Ciclina B (RALEIGH & O'CONNELL, 2000). Em mamíferos, a decisão de entrar na mitose é mediada por uma rede de proteínas que regulam a ativação do complexo ciclina B-Cdk1. Na parada G<sub>2</sub>/M, as proteínas ativas ATM/ATR e Chk1/Chk2 induzem o sequestro, a degradação ou a inibição de fosfatases pertencentes à família Cdc25, as quais normalmente estão envolvidas na ativação de Cdk1 na progressão da fase G<sub>2</sub> para a mitose (KASTAN & BARTEK, 2004).

A cinase Cdk1 ativa, fosforila uma variedade de substratos, incluindo histonas, lâminas nucleares, proteínas associadas ao microtúbulo, fatores de transcrição e fosfatases, resultando em uma reorganização celular característica da mitose. No fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*, além de Cdk1, é necessário também a ativação de uma serina-treonina cinase chamada NIMA (*never in mitosis A*) para a entrada em mitose (FRY & NIGG, 1995; OSMANI & YE, 1996).

### 1.8. Proteína NIMA

A proteína NIMA de *A. nidulans* é uma serino-treonina cinase codificada pelo gene *nimA*, com papel essencial na entrada da mitose (OSMANI *et al.*, 1991a). Além de regular a progressão da fase G<sub>2</sub>/M, esta proteína está envolvida na resposta a danos no DNA, na fosforilação de proteínas com caráter ácido e também na regulação dos eventos mitóticos, incluindo organização do fuso mitótico e formação adequada do envelope nuclear (OSMANI *et al.*, 1988; 2001a; 2001b). Em relação aos danos no DNA, OSMANI *et al.* (2001b) sugerem em alguns dos seus estudos iniciais que a proteína NIMA é requerida durante a mitose como

parte de um ponto de checagem de ciclo celular, envolvida na certificação de que o DNA foi replicado corretamente ou assegurando que este DNA replicado apresentando danos seja reparado antes de ser segregado na mitose.

NIMA tem um tamanho de 79 kDa e apresenta um domínio N-terminal cinásico, o qual apresenta a propriedade única de reconhecer resíduos N-terminais hidrofóbicos em seu substratos, com uma forte seletividade para uma fenilalanina na posição 3. A região não catalítica C-terminal apresenta uma região *coiled-coil* imediatamente após o domínio catalítico, que pode ser importante para formação de oligômeros. Há, ainda, duas sequências PEST que direcionam a proteína NIMA para proteólise em uma via dependente de ubiquitina (Figura 10). Todos estes motivos são importantes para a execução das funções *in vivo* e regulação da proteína (O'CONNELL *et al.*, 2003; O'REGAN *et al.*, 2007).

Algumas serina-treonina cinases, estruturalmente relacionadas à NIMA, têm sido descritas. Estas proteínas foram identificadas baseadas na similaridade de sequência ao domínio catalítico da NIMA. Além disso, várias destas proteínas identificadas tem a mesma disposição dos motivos na porção C-terminal, enquanto outras têm motivos adicionais ou ausência de algum destes motivos não catalíticos (Figura 10). A proteína Kin3 de *S. cerevisiae* foi uma das primeiras proteínas relacionada à NIMA identificadas (BARTON *et al.*, 1992; SCHWEITZER & PHILIPSEN, 1992). Outras proteínas incluem: Fin1, na levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe* (GRALLERT & HAGAN, 2002), Nim1, no fungo *Neurospora crassa* (PU *et al.*, 1995), além de 11 ortólogos em mamífero, designadas de Nek1 a 11 (O'REGAN *et al.*, 2007).

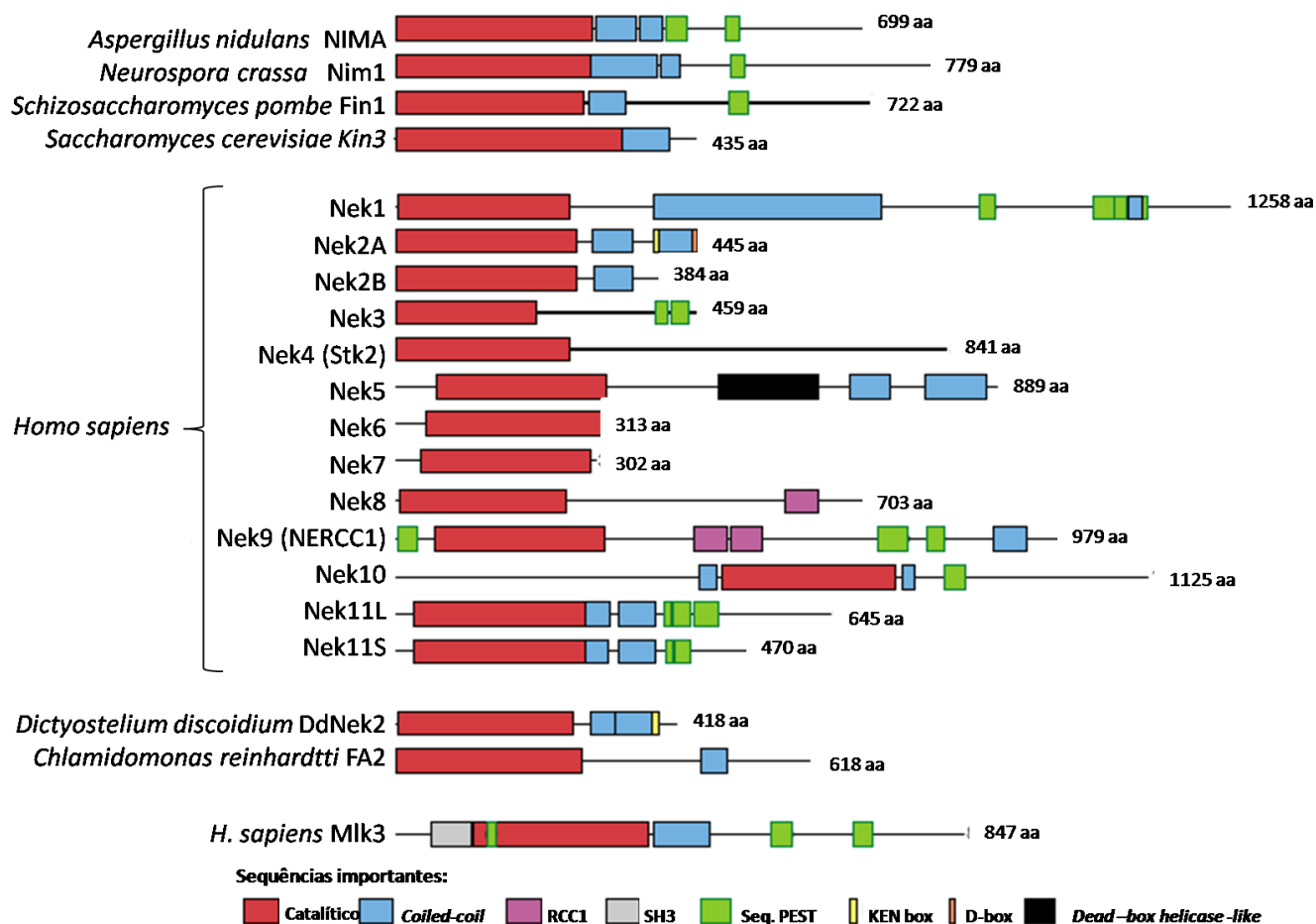


Figura 10. Família Nrk (*NIMA related kinase*). Alinhamento das características estruturais-chaves da família, incluindo: domínio cinásico, sequências PEST, domínios *coiled-coil* e outros domínios (SH3/RCC1). A cinase NIMA de *A. nidulans* é mostrada no topo da figura. As sequências PEST e *coiled-coil* são essenciais para a atividade e regulação de NIMA de *A. nidulans*. aa, aminoácidos. Modificado de O'CONNELL *et al.* (2003).

### 1.8.1. Proteínas relacionadas à NIMA em mamíferos (Nrk ou Nek)

Alguns membros da família das Neks de mamíferos foram caracterizados funcionalmente e parecem atuar na regulação e no controle do ciclo celular. Entre os 11 membros dessa família, Nek1 e Nek11 têm sido descritos na resposta a danos no DNA,



enquanto Nek2 e Nek6 parecem estar relacionados a processos tumorais (BOWERS & BOYLAN, 2004; KOKURYO *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2008; MELIXETIAN *et al.*, 2010, PELEGRINI *et al.*, 2010).

A proteína Nek1 apresenta sequências de localização nuclear (NLS) e exportação nuclear (NES) que podem estar relacionadas com sua função dentro da célula (SURPILI *et al.*, 2003). Muitos estudos foram conduzidos para identificar o papel desta proteína entretanto, a sua função exata ainda não foi determinada. Nek1 parece atuar na progressão da mitose através do recrutamento de proteínas, na manutenção da estrutura do cinetócoro, ligação do cinetócoro a microtúbulos e também na sinalização para a montagem do fuso por mecanismo de ponto de checagem (MAHJOUB *et al.*, 2005). Além disso, foi verificado que a deleção desta proteína em animais aumenta a incidência da doença policística do rim (PKD) com mutantes apresentando esterilidade (machos), dismorfismo facial, retardo no crescimento e anormalidades neurológicas (UPADHYA *et al.*, 2000).

Estudos também sugerem a participação da proteína Nek1 na resposta a danos no DNA. POLCI *et al.* (2004) demonstraram que Nek1 está diretamente envolvida na resposta a danos no DNA induzidos por radiação ionizante e se co-localiza com  $\gamma$ H2AX, proteína importante na resposta a danos no DNA, especialmente quebras duplas (MAH *et al.*, 2010). Células com a proteína Nek1 silenciada apresentam pronunciada sensibilidade a cisplatina e MMS. Além disso, esta proteína é importante para um eficiente ponto de checagem em G<sub>2</sub>/M em resposta as lesões no DNA induzidas por estes agentes genotóxicos (CHEN *et al.*, 2008; PELEGRINI *et al.*, 2010). Além dessa sensibilidade e ausência de checkpoint, recentemente, nosso grupo demonstrou que células Nek1 silenciadas demoram em executar os processos de

reparação de danos no DNA induzidos por MMS, cisplatina e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (PELEGRINI *et al.*, 2010).

Na ausência de Nek1 as proteínas Chk1 e Chk2 não são ativadas. Porém, Nek1 não fosforila diretamente estas proteínas, o que tem sido sugerido que Nek1 pode estar envolvida no transporte intranuclear das proteínas Chk1 e Chk2 ou na ativação de outras proteínas intermediárias necessária para a fosforilação destas cinases, com um papel sinérgico na ativação de outros substratos de ATM/ATR, participando desta forma da sinalização de danos no DNA (CHEN *et al.*, 2008). Utilizando o ensaio de duplo-híbrido em levedura, foi verificado que Nek1 interage com proteínas envolvidas em processos de reparação de DNA, entre elas Mre11, membro do complexo MRX discutido anteriormente, 53BP1 (semelhante a Rad9 de leveduras) e ATRX (Rad54 em leveduras), contudo, a interação com estes possíveis parceiros moleculares na resposta a danos no DNA ainda não foi demonstrada (SURPILI *et al.*, 2003).

Assim como Nek1, a proteína Nek11 é necessária para um eficiente ponto de checagem em G<sub>2</sub>/M em resposta as lesões no DNA induzidas por radiação ionizante. Em resposta a estresse genotóxico, Nek11 fosforila a proteína Cdc25 em resíduos necessários para interação com a proteína  $\beta$ -TrCP ( *$\beta$ -transducin repeat-containing protein*) mediando a poliubiquitinação e degradação da proteína Cdc25 (MELIXETIAN *et al.*, 2009; SORENSEN *et al.*, 2010). A proteína Cdc25 é membro de uma família de fosfatases altamente conservadas que desempenham um papel fundamental na transição entre as fases do ciclo celular durante a divisão celular normal, através da ativação dos complexos ciclina/Cdk (LAVECCHIA *et al.*, 2009). Além disso, a proteína Nek11 é ativada pela proteína Chk1, indicando que Chk1 e

Nek11 atuam em uma via única que controla a proteólise da proteína Cdc25 (MELIXETIAN *et al.*, 2009).

A proteína Nek2 é a mais próxima estruturalmente da proteína NimA de *A. nidullans* com grande similaridade, especialmente no domínio catalítico. Nek2 parece ter diversos papéis durante várias fases do ciclo celular, desde a fase S a múltiplas etapas da mitose, baseados sobre a sua dinâmica expressão e localização sub-celular no citosol, núcleo e porções dos cromossomos (FRY *et al.*, 2002). Evidências apontam para uma possível regulação da organização dos centrossomo (FRY *et al.*, 1998; 2002). Além disso, Nek2 está envolvida na ativação da proteína Hec1, importante na condensação dos cromossomos (CHEN *et al.*, 2002). Nek6 também tem função na progressão mitótica, mas o seu papel exato ainda não foi determinado (LEE *et al.*, 2008; NASSIRPOUR *et al.*, 2010). Os níveis das proteínas Nek2 e Nek8 estão aumentados em células tumorais quando comparadas às células normais indicando que estas proteínas estão envolvidas em processos de tumorigênese. Em função disto, estas proteínas têm sido apontadas como alvos na terapia antitumoral (KOKURYO *et al.*, 2007; NASSIRPOUR *et al.*, 2010; SUZUKI *et al.*, 2010).

### **1.8.2. Proteína Kin3**

Diferente dos eucariotos superiores, a levedura *S. cerevisiae* apresenta somente uma proteína estruturalmente relacionada à NIMA, a proteína Kin3. O gene que codifica esta proteína, constituído por 1308 pares de bases, foi isolado de uma biblioteca de fragmentos genômicos clonados, utilizando sondas de mistura de oligonucleotídeos correspondentes à

parte de uma região altamente conservada no domínio catalítico de serina-treonina cinases (JONES & ROSAMOND, 1990).

A proteína Kin3 é composta por 435 aminoácidos, tem um peso molecular de 51,2 kDa, apresentado um grande domínio serina-treonina cinásico com sequências altamente conservadas que se estende do aminoácido 25 ao 343 (Figura 11A). A sequência Gli-X-Gli-X-X-Gli é predita para interagir com a ribose e o fosfato terminal do ATP, distante 15-20 aminoácidos de um resíduo de lisina que está diretamente envolvido na reação de fosfotransferência. Apresenta ainda o triplete Asp-Fen-Gli, altamente conservado no domínio catalítico de proteínas cinases, e o elemento consenso Asp-X-Trp-Ser-X-Gli, que é frequentemente usado como indicador da atividade cinásica (JONES & ROSAMOND, 1990). Além disso, a presença de um resíduo ácido na posição 41 da proteína NIMA tem sido sugerido como fundamental para sua função, estando conservado nas demais proteínas: Kin3 tem um ácido aspártico na posição 55, Nek1 e Nek11 possuem um ácido glutâmico nas posições 34 e 62, respectivamente (Figura 11B).

O crescimento de células *KIN3* deletadas não é alterado frente a uma variedade de fontes de carbono, incluindo glicose, galactose, etanol, glicerol, maltose, rafinose e sacarose, em ambas as condições aeróbicas e anaeróbicas (SCHWEITZER & PHILIPPSEN, 1992). A superexpressão do gene *KIN3* não resulta em nenhum fenótipo detectável de crescimento (BARTON *et al.*, 1992). Adicionalmente, as células de levedura com o gene *KIN3* deletado apresentam mitose, meiose e conjugação normais, sugerindo que Kin3 não é essencial para estes processos (JONES & ROSAMOND, 1990). Entretanto, semelhante a Nek2 de mamíferos, a proteína Kin3 parece estar envolvida na fosforilação da proteína de segregação cromossômica Hec1, embora não seja fundamental neste processo como a Nek2 em

mamíferos, já que a sua deleção não impede que Hec1 seja fosforilada, sugerindo um papel redundante de Kin3 nesta função com outras proteínas em *S. cerevisiae* (CHEN *et al.*, 2002).

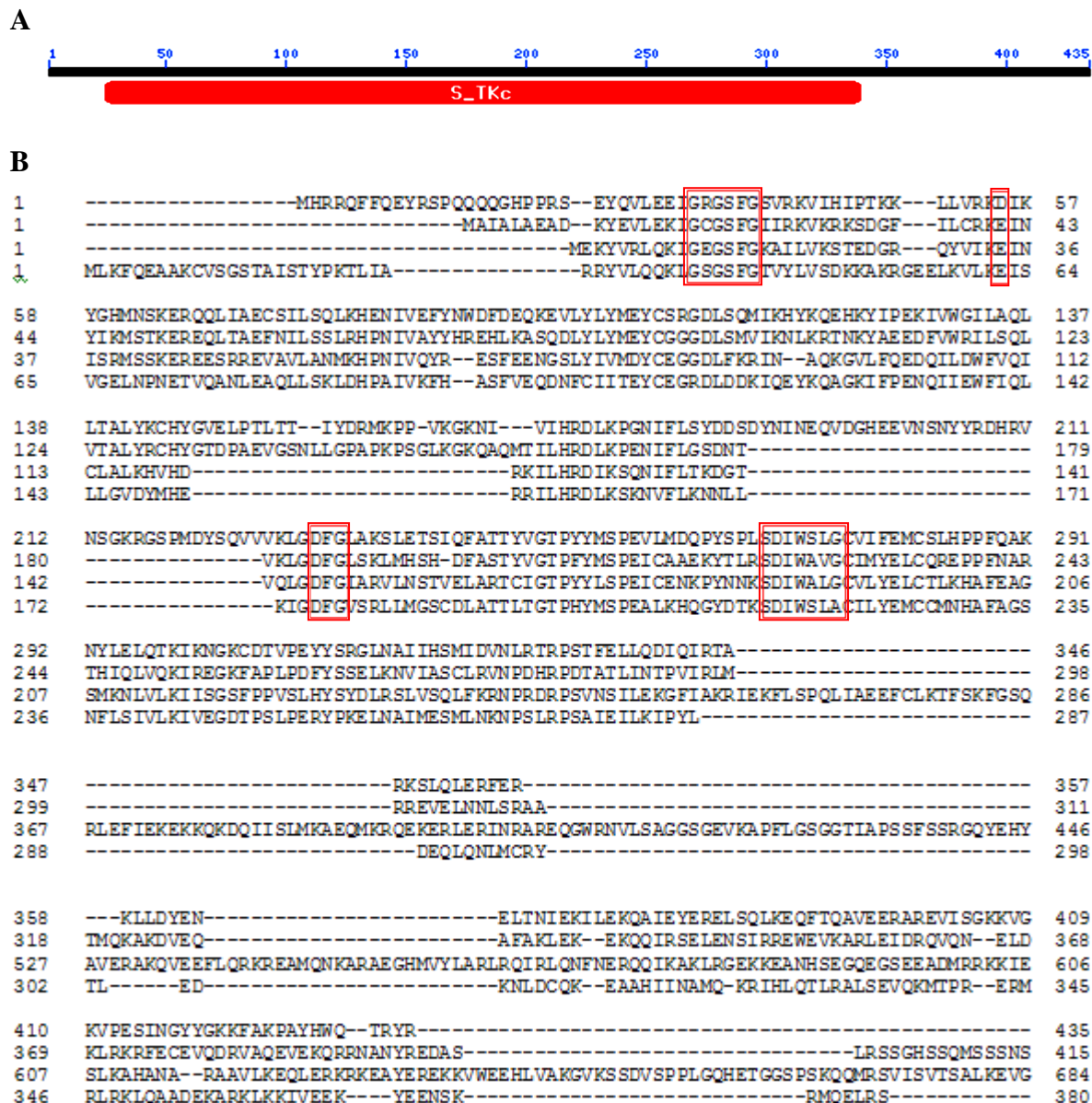
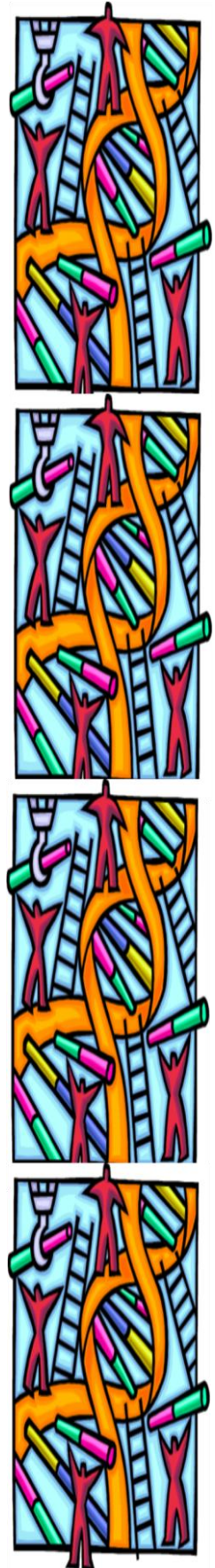


Figura 11. a) Representação da proteína Kin3, com o domínio serina-treonina cinásico em vermelho. b) Alinhamento das proteínas Kin3 de *S. cerevisiae* (linha 1), NIMA de *A. nidulans* (linha 2), Nek1 (linha 3) e Nek11 (linha 4) de mamíferos utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Em destaque as regiões conservadas mencionadas no texto.

Considerando que os resultados fenotípicos, citados acima, indicam que o papel celular de Kin3 está limitado a uma função não essencial ou condicional, esta proteína pode ter funções semelhantes a outras proteínas relacionadas à NIMA, como a Nek1 e Nek11, proteínas não essenciais de mamíferos. O alinhamento das sequências de aminoácidos do domínio cinásico demonstra que Kin3 apresenta 48 % e 51 % de similaridade com as proteínas Nek1 e Nek11 de humanos, respectivamente, enquanto a similaridade de Kin3 com proteína NIMA de *A. nidulans* é de 56 % (Figura 11B).



## OBJETIVOS

## 1. Objetivo Geral

Buscando novas informações que possam auxiliar na compreensão dos mecanismos implicados na sinalização celular após danos no DNA, este trabalho teve como finalidade ampliar o estudo da proteína Kin3 de *Saccharomyces cerevisiae*, avaliando o seu papel na resposta ao estresse genotóxico e interação com parceiros moleculares na resposta a lesões no DNA.

### 1.1. Objetivos específicos:

- Caracterizar o mutante *kin3Δ* através de ensaios de sensibilidade após tratamento com diferentes agentes indutores de danos no DNA;
- Avaliar o perfil de ciclo celular e crescimento do mutante *kin3Δ* durante estresse genotóxico;
- Analisar a expressão do gene *KIN3* e de seu produto protéico durante estresse genotóxico na linhagem selvagem;
- Verificar a ocorrência de quebras na molécula de DNA na linhagem selvagem e na mutante *kin3Δ* após tratamento genotóxico;
- Avaliar a interação genética do produto do gene *KIN3* com produtos dos genes do complexo *MRE11*, *RAD50* e *XRS2*, através de genética clássica.
- Confirmar estas interações com possíveis parceiros utilizando o sistema duplo-híbrido e ensaios bioquímicos de imunoprecipitação. Além disso, definir os domínios de Kin3



requeridos para estas interações, através da expressão de construções truncadas do gene *KIN3* via ‘sistema duplo-híbrido’.

- Elaborar um modelo que demonstre o mecanismo de ação desta cinase na sinalização da reparação de DNA e nos pontos de checagem de ciclo celular.



## CAPÍTULO I

**Kin3 protein, a NIMA-related kinase of *Saccharomyces cerevisiae*,  
is involved in DNA adduct damage response**

**Cell Cycle 9:11, 1-10**

# Kin3 protein, a NIMA-related kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, is involved in DNA adduct damage response

Dinara J. Moura,<sup>1</sup> Bruna Castilhos,<sup>1</sup> Bruna F. Immich,<sup>1</sup> Andrés D. Cañedo,<sup>2</sup> João A.P. Henriques,<sup>1</sup> Guido Lenz<sup>1</sup> and Jenifer Saffi<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biophysics/Biotechnology Center; Federal University of Rio Grande do Sul; Porto Alegre, RS Brazil; <sup>2</sup>Federal University of Pampa; São Gabriel, RS Brazil; <sup>3</sup>Federal University of Health Sciences of Porto Alegre; Porto Alegre, RS Brazil

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*, Kin3 protein, NIMA, DNA damage, cell cycle, checkpoint control

**Abbreviations:** NIMA, never-in mitosis gene A; Nrk, NIMA-related kinases; MMS, methyl methane sulfonate; HN2, nitrogen mustard; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; DSB, DNA double strand breaks

Kin3 is a nonessential serine/threonine protein kinase of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* with unknown cellular role. It is an ortholog of the *Aspergillus nidulans* protein kinase NIMA (Never-In Mitosis, gene A), which is involved in the regulation of G<sub>2</sub>/M phase progression, DNA damage response and mitosis. The aim of this study was to determine whether Kin3 is required for proper checkpoint activation and DNA repair. Here we show that *KIN3* gene deficient cells present sensitivity and fail to arrest properly at G<sub>2</sub>/M-phase checkpoint in response to the DNA damage inducing agents MMS, cisplatin, doxorubicin and nitrogen mustard, suggesting that Kin3 can be involved in DNA strand breaks recognition or signaling. In addition, there is an increase in *KIN3* gene expression in response to the mutagenic treatment, which was confirmed by the increase of Kin3 protein. We also showed that co-treatment with caffeine induces a slight increase in the susceptibility to genotoxic agents in *kin3Δ* cells and abolishes *KIN3* gene expression in wild-type strain, suggesting that Kin3p can play a role in Tel1/Mec1-dependent pathway activation induced after genotoxic stress. These data provide the first evidence of the involvement of *S. cerevisiae* Kin3 in the DNA damage response.

## Introduction

The genome integrity of the cells is kept by DNA damage response pathways which ensure the faithful maintenance and replication of the genome in spite of genotoxic stress. The activation of these pathways leads to gene transcription, temporary cell cycle arrest and activation of DNA repair, and, in some cases, promotes senescence and cell death to eliminate damaged cells.<sup>1-3</sup> Once DNA lesions are detected, the checkpoint transducers transmit and amplify the checkpoint signal to downstream targets such as the DNA-repair apparatus and the cell cycle machinery. Often, protein modifications by phosphorylation are involved in the transmission of the signal or activation of these targets by influencing the stability or activity of proteins that are implicated in checkpoint maintenance or cell cycle progression.<sup>1,4,5</sup>

Among the many protein kinase families described, members of the NIMA-related kinases (Nrk), identified as participating in the control of cell cycle, are less well functionally characterized.<sup>6</sup> NIMA (Never in Mitosis, gene A) is a serine-threonine kinase identified in *Aspergillus nidulans* with critical role in the regulation of the G<sub>2</sub> and mitosis (G<sub>2</sub>/M) checkpoint of the cell cycle and is important for orderly mitotic events including spindle

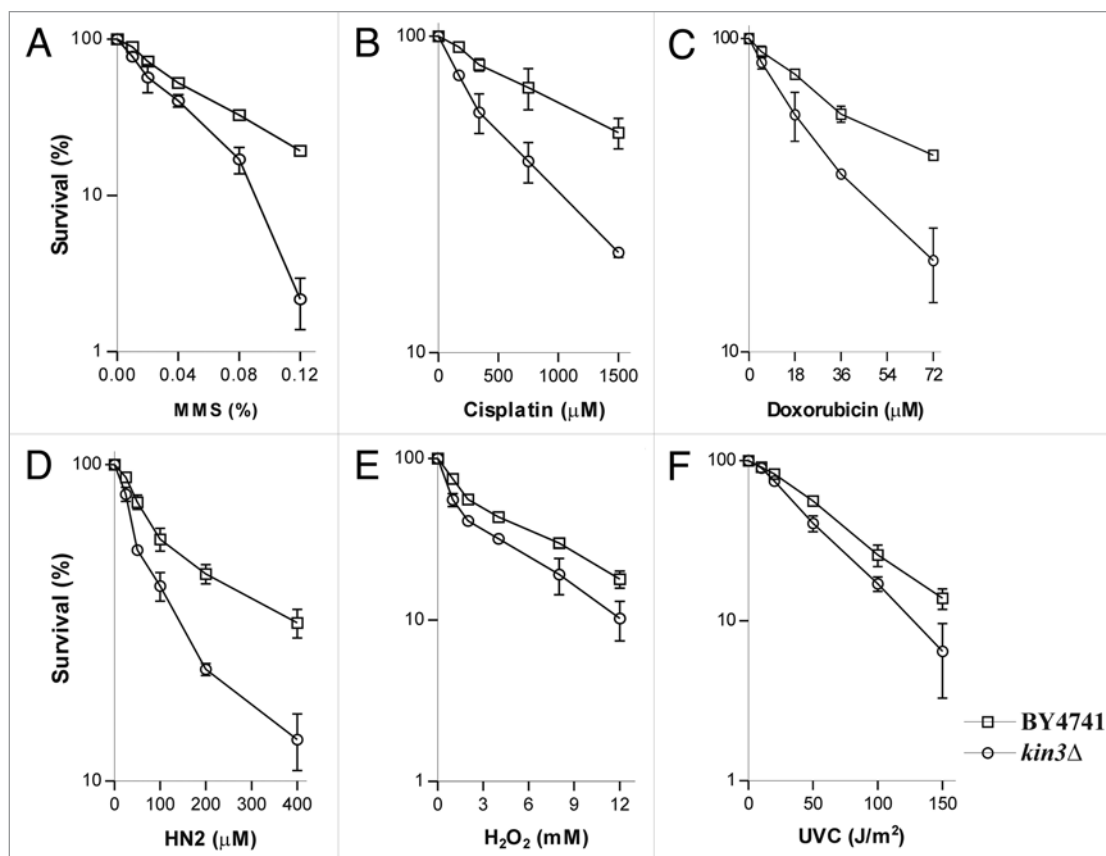
organization and proper formation of the nuclear envelope.<sup>7-10</sup> Osmani et al. showed that NIMA is increased in response to DNA damage, and suggest that this kinase is required for the cell cycle checkpoint to ensure that DNA damage is repaired before replication.<sup>9</sup> Protein kinases structurally related to fungal NIMA have been isolated from various organisms based on the sequence similarity of their catalytic domains.<sup>6,11-15</sup> These are highly conserved in evolution, with lower eukaryotes having a single member, and mammals normally presenting multi-gene encoding related proteins.<sup>6,16</sup> Eleven human NIMA-related proteins have been described and these proteins are involved in mitotic progression, microtubule organization, mitotic spindle formation and DNA damage response.<sup>17-22</sup>

In *Saccharomyces cerevisiae*, a structural homolog of *nimA*, *KIN3* (FUN52 or NPK1) was identified in the early nineties.<sup>14,23,24</sup> The *KIN3* gene is located on chromosome I and its nucleotide sequence analysis reveals a 1,308 base pairs (bp) open reading frame encoding a 51,203 Da protein (*Saccharomyces* Genome Database). The Kin3 is a nonessential protein with unknown cellular role. The yeast strain with a *KIN3* gene deletion was able to grow on a variety of carbon sources (ethanol, galactose, glucose, glycerol, maltose, raffinose or sucrose), showed normal growth under aerobic

\*Correspondence to: Jenifer Saffi; Email: jenifers@ufcspa.edu.br

Submitted: 01/10/10; Revised: 03/14/10; Accepted: 03/25/10

Previously published online: [www.landesbioscience.com/journals/cc/article/2348](http://www.landesbioscience.com/journals/cc/article/2348)



**Figure 1.** Sensitivity of BY4741 wild-type (open square) and *kin3Δ* (open circle) after treatment with (A) MMS, (B) cisplatin, (C) doxorubicin, (D) nitrogen mustard-HN2, (e) hydrogen peroxide- $H_2O_2$  or (F)  $UVC_{256}$ . Stationary cells were treated for 1 hour with mutagen in PBS at 30°C. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

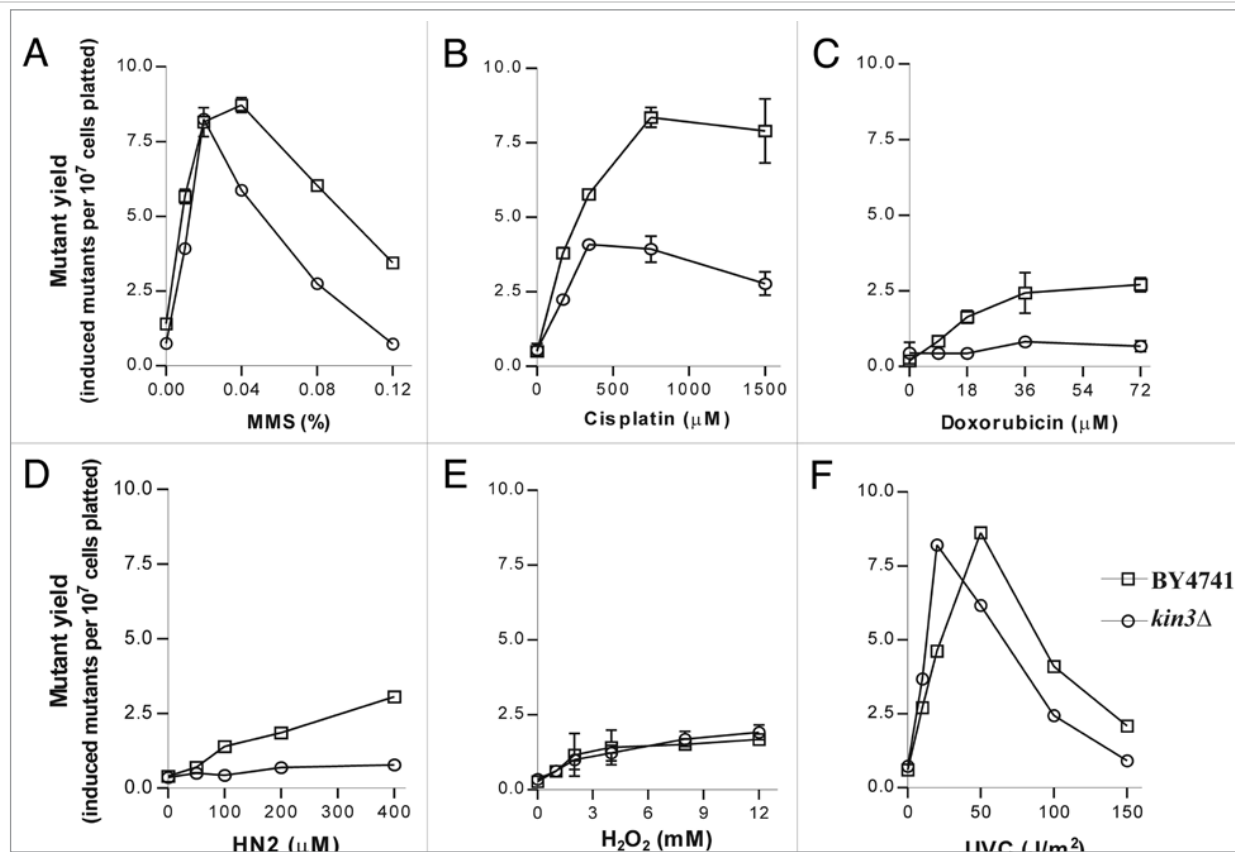
and anaerobic conditions and presented normal mating and sporulation.<sup>24</sup> Likewise, the overexpression of the *KIN3* gene resulted in no detectable phenotype modification.<sup>23</sup> Furthermore, Chen et al. suggest that Kin3p might play a redundant role in the phosphorylation of Hec1p during G and M phases.<sup>25</sup>

In order to obtain new insight about the Kin3 protein function, this study aims to determine whether Kin3 is required for proper checkpoint activation and DNA repair. Here we characterized the sensitive phenotype of *kin3Δ* *S. cerevisiae* strain to different types of DNA adducts induced by methyl methane sulfonate (MMS), cisplatin, doxorubicin and nitrogen mustard (HN2) compared to its isogenic wild-type strain. We also showed that *KIN3* gene deficient cells are defective in G<sub>2</sub>/M-phase checkpoint in response to DNA adducts damage, and like Nek1 and Nek11 human proteins,<sup>17,22,26</sup> Kin3 can be involved in DNA strand breaks recognition mediating G<sub>2</sub> cell cycle arrest in Tel1/Mec1-dependent pathway. In addition, our results show that in response to mutagenic treatment, there is an increase in *KIN3* gene expression, which was confirmed by increased of Kin3 protein.

## Results

### ***KIN3* deletion makes yeast more sensitive to different mutagenic agents.** The relative importance of checkpoint and repair

proteins can be measured by determining the survival of mutants defective in the respective proteins after increasing doses of a DNA damaging agent.<sup>27</sup> *KIN3* deletion produced a decrease in survival when compared to the wild-type strain (BY4741) after treatment with cisplatin, doxorubicin, HN2 or MMS (**Fig. 1A–D**). Survival assays showed a *kin3Δ* sensitivity was about two times higher than wild-type for cisplatin, doxorubicin and HN2. Additionally, MMS treatment induces a sensitivity increase of ten-fold at higher concentration (0.12%) in *kin3Δ* cells. Other kinase checkpoint/repair yeast mutants (*mec1Δ*, *mre11Δ*, *rad9Δ* and *rad53Δ*) showed increased sensitivity to at least one of these genotoxic agents.<sup>3,28–31</sup> The role of Kin3 protein in genetic stability was also investigated by the forward mutation rate of the *CAN1* gene. After MMS treatment the *kin3Δ* strain presented a slight decrease in mutagenesis when compared to the wild-type strain (**Fig. 2A**), while the treatment with cisplatin, doxorubicin and HN2 induced a minimum three-fold decrease in number of locus-specific *CAN1* forward mutations in *kin3Δ* strain at higher concentrations (**Fig. 2B–D**). These results are indicative of a possible role of Kin3 in response to different DNA adducts lesions. A less marked survival decrease was seen after hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and UVC challenges in *kin3Δ* strain when compared to wild type strain (**Fig. 1E and F**), with a similar magnitude of mutagenesis in both strains (**Fig. 2E and F**). Therefore,  $H_2O_2$



**Figure 2.** Mutation induction in BY4741 wild-type (open square) and *kin3Δ* (open circle) after treatment with (A) MMS, (B) cisplatin, (C) doxorubicin, (D) nitrogen mustard-HN2, (e) hydrogen peroxide H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or (F) UVC<sub>256</sub>. Induced forward mutations in the *CAN1* locus per 10<sup>7</sup> surviving stationary phase cells in each treatment were treated for 1 hour with mutagen in PBS at 30°C. All results are expressed as mean ± standard deviation of three independent experiments.

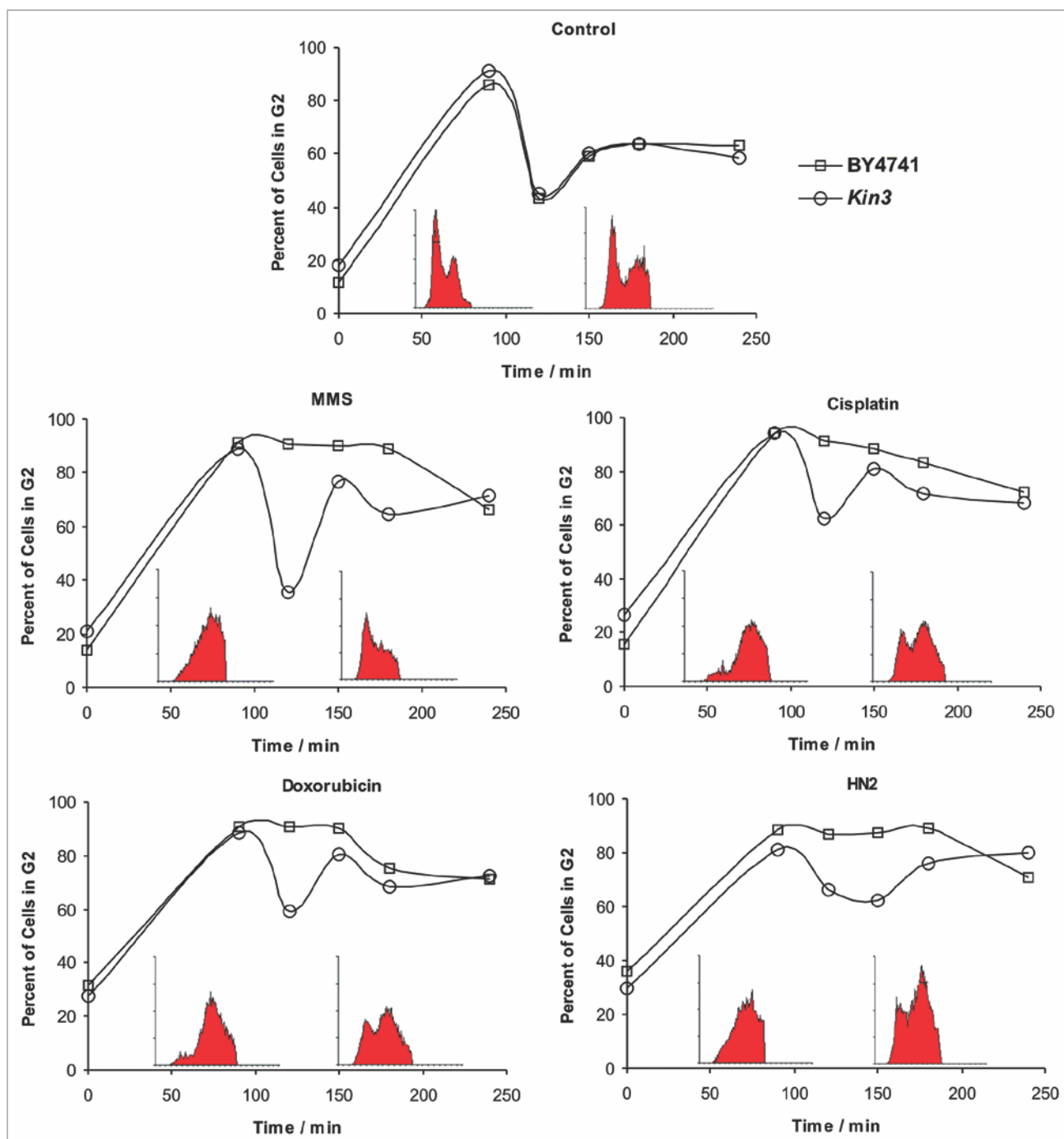
and UVC were not used in the subsequent experiments to verify the functions of Kin3 protein in *S. cerevisiae*.

**G<sub>2</sub>-M cell cycle checkpoint is defective in Kin3-deficient cells.** Cells with DNA damage trigger a common signal transduction pathway called the DNA damage checkpoint, which delays cell cycle transitions until repair has occurred. Since we observed the involvement of Kin3 in response to DNA damage, we sought to determine whether this effect could be due to defective checkpoint activation. We evaluated the cell cycle distribution in *kin3Δ* and wild-type cells synchronized with mating pheromone and treated with low concentrations of cisplatin, doxorubicin, HN2 and MMS. No difference in cell cycle distributions between wild-type and *kin3Δ* strains under normal growth conditions was observed (not shown). In most cases, the alkylating agent MMS activates an S phase checkpoint.<sup>33</sup> However, eventually cells treated with MMS can progress through S phase and accumulate in G<sub>2</sub>/M. We did not observe detectable S phase delay following alkylating damage in wild-type cells. As can be seen in **Figure 3B** under MMS treatment wild-type cells arrested in the G<sub>2</sub> phase, while *kin3Δ* cells continued the progression through the cell cycle completing the cycle in about 120 min. Probably, wild-type cells bypass alkylating damage during replication and defer the completion of repair until the G<sub>2</sub> phase

of the cell cycle. Cisplatin and nitrogen mustard lead to G<sub>2</sub> delay in budding yeast and a similar phenomenon occurs after doxorubicin treatment where a G<sub>2</sub> arrest is triggered.<sup>27,31,36,37</sup> Our results are consistent with these findings since we show that cisplatin, doxorubicin and HN2 treated *kin3Δ* cells fails to arrest in G<sub>2</sub>/M phase, while wild type cells remain arrested in G<sub>2</sub> (**Fig. 3C–E**). This result suggests that absence of Kin3 is associated with defect of cells to arrest at G<sub>2</sub>/M phase checkpoints after DNA adducts damage.

To improve understanding of the consequences of this lack of checkpoint we also evaluate the growth of cells under these conditions by cell density analyses. The wild-type cells exposed to mutagenic treatments showed arrest in growth, retake growth only after 180 minutes (**Fig. 4**, upper graph), in accordance to the cell cycle profile in which the cells treated with cisplatin or doxorubicin restarted the cell cycle, out of G<sub>2</sub> phase, after 180 min (**Fig. 3C and D**), and HN2 or MMS treatments induced a longer delay in G<sub>2</sub>, with cells resuming the normal cell cycle only after 240 min (**Fig. 3B and E**). Already *kin3Δ* cells had normal growth up to around 180 min, after they stopped growing (**Fig. 4**, lower graph).

**Mutagenic treatment induces DNA fragmentation in wild-type and *kin3Δ* cells.** DNA strand breaks after cisplatin,



**Figure 3.** BY4741 wild-type and *kin3Δ* cells in G<sub>2</sub> phase of the cell cycle after different treatments as measured by flow cytometry analysis. Graphics represent the percent distribution of WT (open square) and *kin3Δ* (open circle) cells with 2C DNA content 240 min after synchrony release. Below, histograms show the progression of the cell cycle at 120 min in WT control (left column) and *kin3Δ* mutant (right column) cells (red plots). Cells arrested in G<sub>1</sub> by  $\alpha$ -factor were released into SynCo medium without (A) or with mutagens: MMS (0.01%; B), cisplatin (170  $\mu$ M; C), doxorubicin (9  $\mu$ M; D) or nitrogen mustard-HN2 (25  $\mu$ M; D). Data is the average from at least three independent experiments and standard deviations ranged from 1 to 5 (not shown in the graph).

doxorubicin, HN2 and MMS exposure can be formed as a consequence of DNA repair and/or replication processes.<sup>36-40</sup> Nek1 and Nek11 human proteins have been shown to be involved in the response to DNA double strand breaks (DSB).<sup>17,20-22</sup> In order to verify if our treatment induces breaks in DNA and the possible

involvement of Kin3 in this response, likewise the case of human Neks, we performed an alkaline gel electrophoresis that detects DNA fragmentation, as consequence of single and double DNA strand breaks.<sup>43,44</sup> All mutagenic treatments induce DNA fragmentation in wild-type and *kin3Δ* cells when evaluated after

120 min of treatment (Fig. 5A). However, the wild-type cells showed a decrease in the DNA fragmentation over time, while the fragmentation in *kin3Δ* cells persisted, indicating that these cells are not proficient in repairing of DNA damage (Fig. 5B).

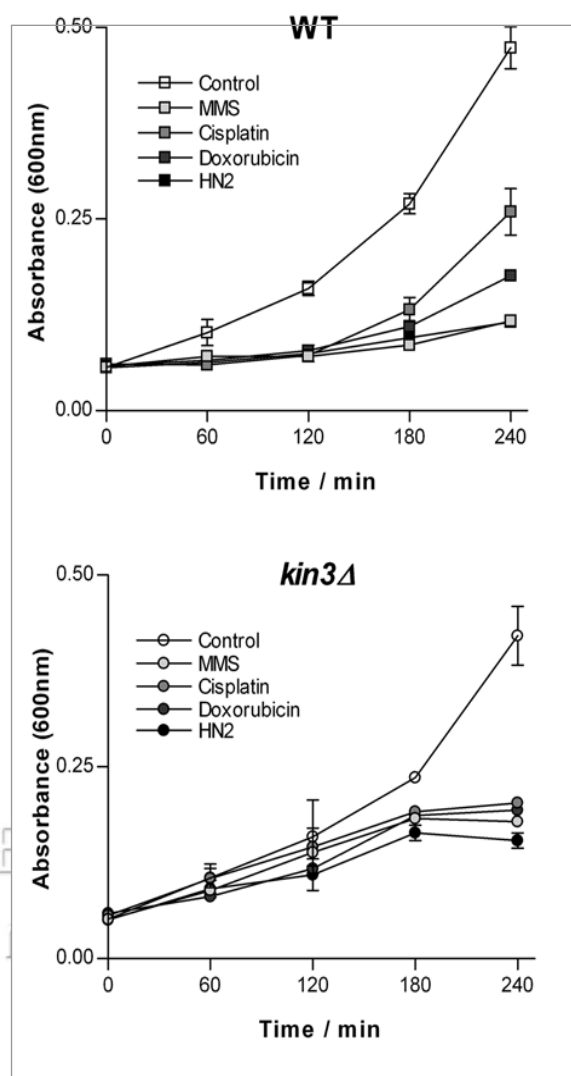
**KIN3 expression during mutagenic stress.** We analyzed the pattern of *KIN3* expression in the wild-type strain with the pMELβ2 reporter plasmid, which contained 1,100 bp of DNA upstream of the *KIN3* translation start site, during mutagenic treatment at several time points (0–240 minutes). This upstream sequence was chosen because it contains two TATA box consensus sequences.<sup>45</sup> In response to mutagenic treatment, the *KIN3* promoter was activated (Fig. 6). A significant increase in *KIN3* promoter induction occurred after 60 min of treatment with MMS, doxorubicin and HN2 (Fig. 6A). In cells treated with cisplatin, this increase was more significant after 90 min of treatment. After 150 min, no changes were observed in *KIN3* gene expression with any mutagen. Wild-type cells with an empty pMELβ2 plasmid were used as a negative control, showing β-galactosidase levels of less than 0.5 units. In addition, a direct measure of mRNA expression was performed using semi-quantitative RT-PCR, and the result was similar to that observed in reporter assays (Fig. 6B). This was confirmed by western blot analysis of Kin3 protein expression (Fig. 6C).

#### Absence of Kin3 results in increased sensitivity to caffeine.

After genotoxic damage checkpoint proteins are often recruited to DNA lesions to allow the repair.<sup>46</sup> In the yeast *S. cerevisiae*, central components of the checkpoint machinery are the kinases Mec1 (homolog of human ATR) and Tel1 (homolog of human ATM). Mec1/Tel1 signal in response to DNA damage can activate the G<sub>2</sub>/M checkpoint by phosphorylation of many proteins before cell division until DNA lesion has been repaired.<sup>1,2,46</sup> Caffeine has been demonstrated to override DNA damage checkpoints in a number of organisms by inhibiting the DNA damage checkpoint transducer such as Tel1 and Mec1.<sup>47,48</sup> Therefore, we examined the effect of caffeine on *KIN3* deficient cells to address the possible involvement of Mec1/Tel1-mediated signaling. Treatment with caffeine alone did not induce differential response on wild-type and *kin3Δ* cells. However, the co-treatment of caffeine induces a slight increase in sensitivity to genotoxic agents (Fig. 7), abolishing the checkpoint and, probably, with cells re-entering into mitosis, leads to cell death. To confirm our hypothesis, we have also measured the *KIN3* expression using semi-quantitative RT-PCR in wild type cells 90 min after co-treatment with caffeine plus mutagenic agents. Caffeine abolished *KIN3* expression induced by MMS, cisplatin, doxorubicin and HN2 in wild type cells (Fig. 8). This response indicates that the caffeine-sensitive pathways mediate the Kin3-activating signal, suggesting that Kin3p can play a role in Tel1/Mec1-dependent pathway activation induced after genotoxic damage.

## Discussion

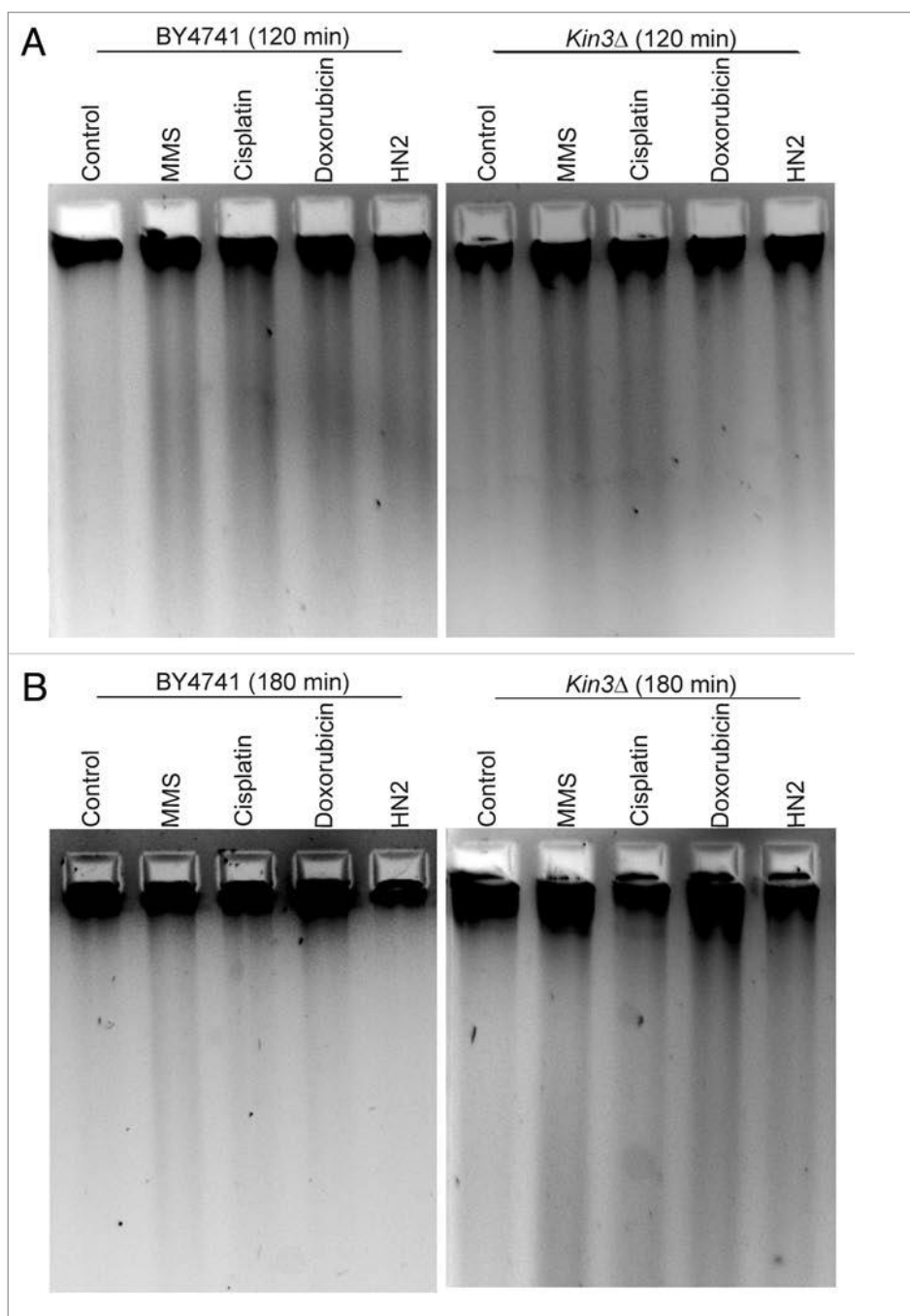
In this study, we demonstrate that Kin3 is a new yeast DNA damage response protein important to proper checkpoint and DNA repair following exposure to DNA adducts inducers. *KIN3* deleted cells have an increased sensitivity to cisplatin, doxorubicin, HN2 and MMS (Fig. 1) and fail to arrest the cell cycle progression at G<sub>2</sub>/M checkpoint (Fig. 3) after exposure to these



**Figure 4.** Cell density measured with a spectrophotometer: values represent the O.D. at 600 nm. Cells arrested in G<sub>1</sub> by  $\alpha$ -factor were released into SynCo medium plus either MMS (0.01%), cisplatin (170  $\mu$ M), doxorubicin (9  $\mu$ M) or nitrogen mustard-HN2 (25  $\mu$ M) and evaluated during 240 min. the results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

agents. The DNA strand breaks persistence in *Kin3Δ* cells (Fig. 5) suggests that Kin3 may be involved in recognition and signaling of these breaks ensuring that the repair occurs efficiently.

DNA adducts are common injuries that can be induced by the mutagenic agents used in this work,<sup>38,39,42,49,50</sup> and despite of the different primary type of DNA lesions induced, we showed that cisplatin, doxorubicin, HN2 and MMS are able to generate DNA fragmentation (Fig. 5). In fact, it is well known that DNA bulky adducts can create replication-dependent DNA strand breaks.<sup>27,39-41</sup> Furthermore, breaks, in special DSBs, can be a consequence of DNA repair processes, since DNA adduct lesions involve a complex interplay among a series of DNA repair pathways, including nucleotide excision repair (NER), recombination repair (HR or NHEJ) and translesion synthesis (TLS).<sup>37,39-41,51-53</sup> Among human Nrk proteins, Nek1, Nek6 and Nek11 have been closely related



**Figure 5.** Alkaline gel electrophoresis of DNA extracted from BY4741 wild-type cells and *kin3Δ* cells untreated or treated with MMS (0.01%; B), cisplatin (170  $\mu$ M; C), doxorubicin (9  $\mu$ M; D) or nitrogen mustard-HN2 (25  $\mu$ M; D). DNA was extracted after 120 minutes (A) and 180 minutes (B) of treatment with mutagens.

to DNA damage response, although quite differently.<sup>17-22, 26</sup> While the inhibition of Nek6 is required for proper cell cycle arrest upon DNA damage, Nek1 and Nek11 activation are important for efficient DNA breaks recognition, mediating  $G_2$  cell cycle arrest after DNA damage checkpoint control and DNA damage repair, and exposure to DNA damaging agents, with a role in regulating the similarly to Kin3, are involved in the response to DNA damage sequence and fidelity of genetic information before mitotic entry induced by cisplatin, doxorubicin and MMS, as well as in response during mutagenic stress. Although it is premature to assume the to ionizing radiation (IR) and ultraviolet radiation (UVC).<sup>17,20,22,26</sup> functional role and its exact mechanism, our data support the Moreover, Nek1 colocalizes with  $\gamma$ -H2AX and NFB1/MDC1, hypothesis that Kin3 might contribute effectively in the response

two key proteins involved very early in the response to DNA double-strand breaks,<sup>22</sup> and evidences suggest a possible Nek1 interaction with Mre11 protein (subunit of MRN complex), 53BP1 and ATR X proteins (Rad54p in yeast),<sup>54</sup> that take part in processes associated with the DSB repair at the  $G_2/M$  transition phase.

Checkpoints play a critical role in maintaining genetic stability by ensuring that DNA repair mechanisms correct DNA damage before replication.<sup>1</sup> A functional checkpoint response in *S. cerevisiae* requires the phosphoinositide 3-kinase related kinases Mec1 (ATR) and Tel1 (ATM), principal signaling molecules involved in the DNA damage response, and its binding partners Rad9, Rad53 (Chk2), Mre11/Rad50/Xrs2 complex (MRX; MRN in humans), Rad24/Rfc2-5 and Ddc1/Mec3/Rad9 (human Rad9/Hus1/Rad1) DNA clamps.<sup>3</sup> It is well established that the DNA damage response comprises activation of these proteins, and that interference with these mechanisms leads to disruption of the  $G_2/M$  checkpoint, giving rise to frequently aberrant mitoses after genotoxic stress which might affect cell viability.<sup>1-5</sup> Our results showed that *kin3Δ* cells fail to arrest at the  $G_2/M$ -phase checkpoint (**Fig. 3**) and die (**Fig. 1**) in response to DNA damage. Moreover, Mec1 (ATR) and Tel1 (ATM) are inhibited by caffeine,<sup>47,48</sup> and we showed that caffeine increase sensitivity of Kin3 defective cells to cisplatin, doxorubicin, HN2 and MMS (**Fig. 7**) and abolishes the KIN3 gene expression in wild type cells (**Fig. 8**). These observations suggest a possibility that Kin3 might be a player in Mec1/Tel1-mediated pathway; however, the exact contribution of Kin3p in checkpoint activation in these conditions remains unknown. In the same way, the human Nek1 and Nek11 deficient cells fail to properly arrest at  $G_2/M$ -phase checkpoints after DNA damage, and this probably occurs in an ATM (Tel1) and ATR (Mec1) dependent manner, through Chk1 (Rad53) and/or Chk2 interaction, in which Nek1 has been identified to act upstream of Chk1 and Chk2,<sup>17</sup> while Nek11 is activated directly by Chk1.<sup>26</sup>



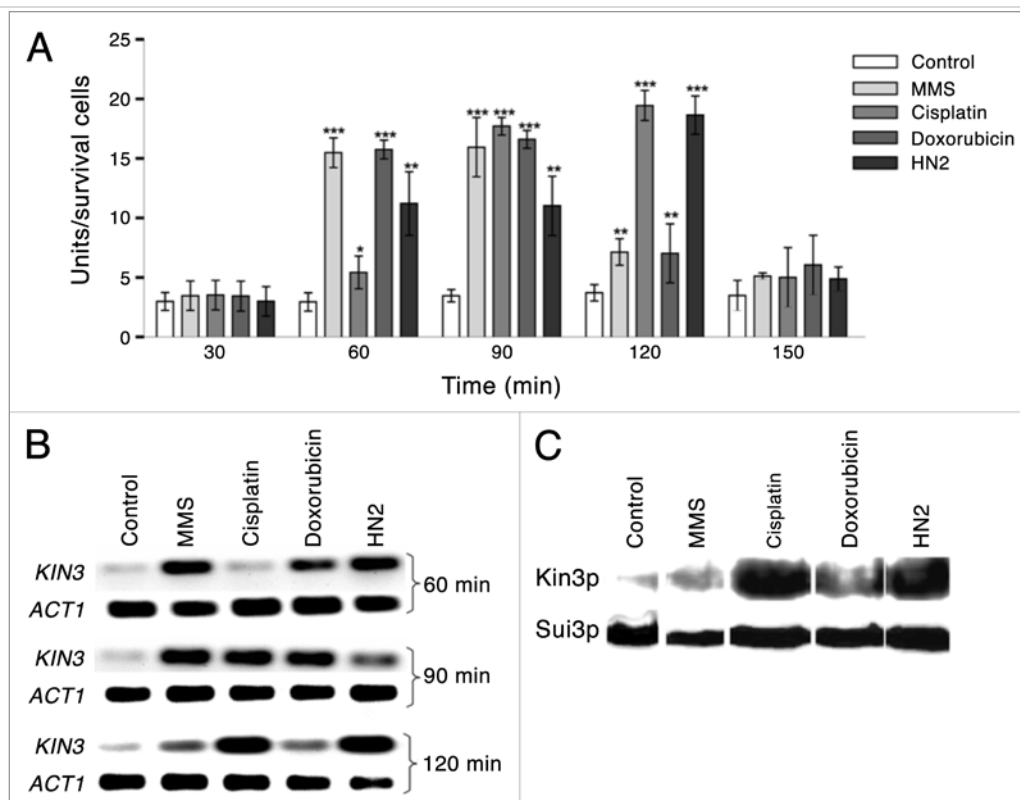


Figure 6. Expression of *KIN3* and Kin3p during mutagenic stress. (A) Expression of the *KIN3* promoter as measured by beta-galactosidase activity. (B) *KIN3* expression as measured by semi-quantitative RT-PCR. The upper row shows the expression of *KIN3* and the lower row shows the expression of *ACT1* (constitutive control). (C) Kin3p expression analysis was performed with protein extracted after 120 min treatments with different mutagens. The upper row shows the expression of Kin3p and the lower row shows the expression of Sui3 (constitutive control). \*\*\*Data significant in relation to control (untreated cells) at  $p < 0.001$ ; \*\* at  $p < 0.01$ ; \* at  $p < 0.05$ /one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

to DNA breaks, possibly in a Mec1/Tel1 dependent pathway. Taking into account, that the Kin3 deficient cells phenotype is quite similar to those already described for other Nrks and the yeast advantages<sup>55</sup> (such as ease genetic manipulation and fast growth), combining a high level of conservation between its cellular processes with those of mammalian cells, the search for a functional relationship between Nrks and checkpoint/repair proteins in *S. cerevisiae* is quite interesting. Thus, the results presented here can give impetus in search of new partners to interact with Kin3. In this sense, preliminary results of our research group indicate that Kin3 interacts with Tel1/Mec1 upstream and downstream DNA damage response proteins (to be submitted elsewhere). This new insights of the Kin3-associated machinery will provide a better understanding of the mechanisms that control DNA-repair mechanisms and coordinate repair with cell cycle progression to preserve genome integrity.

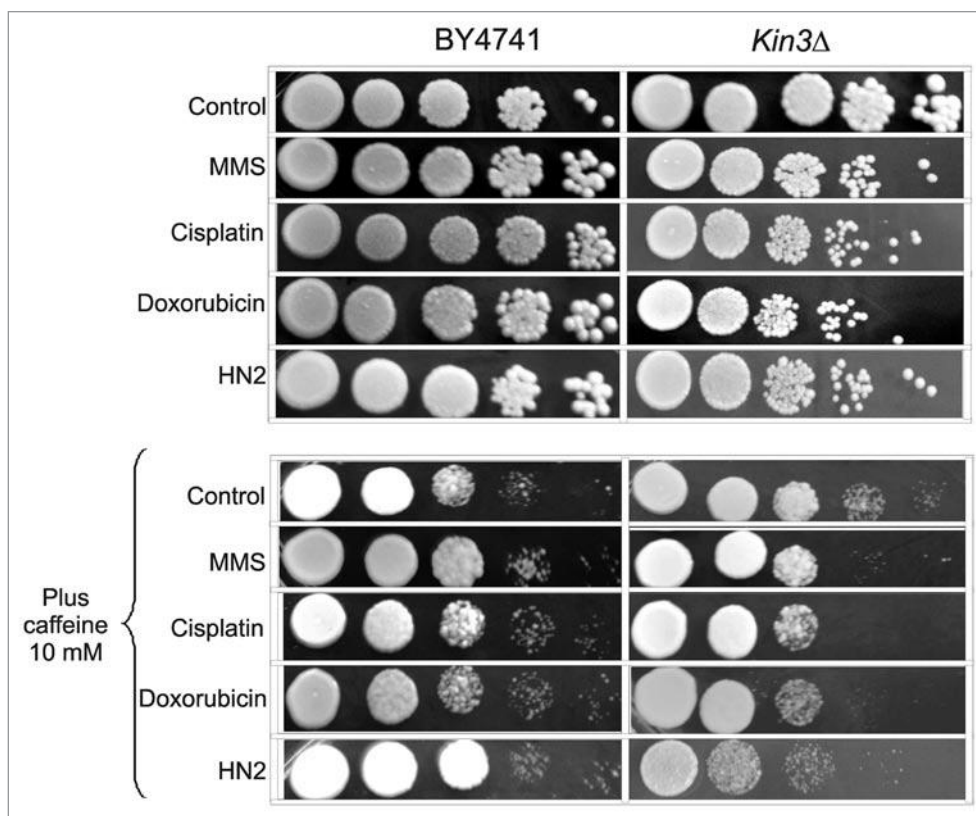
### Materials and Methods

**Strains and culture conditions.** The yeast strains used in this study were BY4741 (wild-type, WT; *MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*) and *kin3Δ* (*MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*; *KIN3::kanMX4*) from Euroscarf. The Escherichia coli strain XL1 blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'* *proAB*])

*lacIqZ.M15 Tn10 (Tetr)*]-Stratagene) was employed for plasmid manipulation and propagation. To ensure that our observations were not specific of the single BY4741 background, we also evaluated the DNA damage responses in FF1833 background (*Mata*; *his7-3*; *leu2-1,112*; *lis1-1*; *trp1-289*; *ura3-52*), in which the *KIN3* gene was disrupted using a *kin3Δ::URA3* disruption cassette, in accordance to Gietz and Woods protocol.<sup>56</sup> The results were consistent with those presented here, warranted that these effects are direct consequences of Kin3 inactivation (not shown).

Yeast media and bacterial genetic procedures were performed as described by Burke et al.<sup>57</sup> and Sambrook et al.<sup>58</sup> respectively. A complete medium (YPD) containing 0.5% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose was used for routine yeast growth. Auxotrophy markers were controlled on synthetic medium—SynCo (containing 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% ammonium sulfate and 2% glucose) supplemented with the appropriate amino acids and bases. For plates, the medium was solidified with 2% bacto-agar.

**Yeast survival assays.** Stationary phase cells were obtained by inoculation of an isolated single colony into liquid YPD. After 48 hours, cells were washed in 0.9% NaCl and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 20 mM; pH 7.4) to a titer of  $1 \times 10^8$  cells/mL. In order to evaluate sensitivity to different mutagens, cells were treated in PBS with either



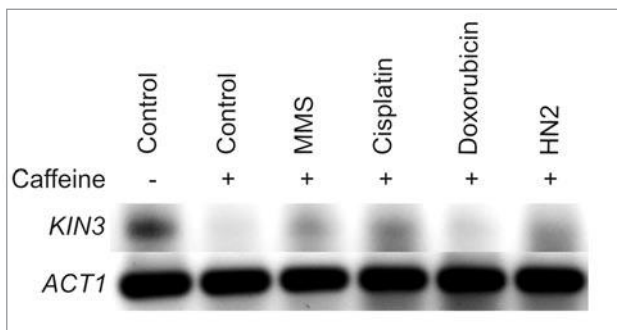
**Figure 7.** Sensitivity to mutagenic agents plus caffeine in the drop assay. A 10  $\mu$ L aliquots suspension of yeast in five different 1:10 dilutions (from  $1 \times 10^7$  cel/mL to  $1 \times 10^3$  cel/mL) were spotted onto rich media plates with or without MMS (0.005%), cisplatin (85  $\mu$ M), doxorubicin (4.5  $\mu$ M) or HN2 (12.5  $\mu$ M) plus caffeine (10 mM).

methyl methane sulfonate (MMS—Sigma) ranging from 0.01% to 0.12%; cisplatin at concentrations from 170 to 1,500  $\mu$ M; doxorubicin (Sigma) in the concentration range of 9 to 72  $\mu$ M; hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>—Sigma) with concentrations ranging from 1 to 12 mM, or nitrogen mustard (HN2—Sigma) at concentrations ranging from 25 to 400  $\mu$ M; for 1 hour in a rotary shaker at 30°C in the dark. After treatment, cells were appropriately diluted and plated in triplicate on solid SynCo. Sensitivity to UV<sub>254nm</sub>(UVC) was assayed by irradiating cells plated on solid

medium with doses ranging from 0 to 150 J/m<sup>2</sup> (Stratalinker, Stratagene). All plates were incubated at 30°C for 3 days to determine survival. Assays were repeated at least three times, and plating was carried out in triplicate for each treatment.

**Mutagenesis evaluation.** Forward mutation was measured with the canavanine resistance assay (*CAN1*→*can1R*) after induction with MMS, cisplatin, doxorubicin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HN2 or UVC. The concentration of canavanine in SynCo-Arg medium was 60  $\mu$ g/mL.<sup>59</sup> Plates were incubated in the dark at 30°C for 3–5 days before counting the colonies. Mutant yield values were scored per treated cells according to the method of Eckardt and Haynes.<sup>60</sup> Assays were repeated at least three times, and plating for each treatment was in triplicate.

**Cell synchronization and cell cycle analysis.** Cells were synchronized in G1-phase by resuspending exponential phase cultures ( $5 \times 10^6$  cells/mL) in fresh YPD with 3  $\mu$ g/mL of the yeast pheromone  $\alpha$ -factor (Sigma) for 2 hours. After microscopic confirmation of growth arrest,  $1 \times 10^7$  cells were washed with PBS, resuspended in SynCo., medium and treated with either MMS (0.01% and 0.04%), cisplatin (170  $\mu$ M and 750  $\mu$ M), doxorubicin (9  $\mu$ M and 36  $\mu$ M), or HN2 (25  $\mu$ M and 100  $\mu$ M), in a rotary shaker at 30°C in the dark. For flow cytometry analysis, cells were withdrawn at each time point, spun down, washed and fixed in absolute ethanol. Cells were washed with water and then stained with 16  $\mu$ g/mL propidium iodide (Sigma) in the presence of 0.1 mg/mL RNase A (Invitrogen).<sup>57</sup> Samples were analyzed



**Figure 8.** Caffeine abolishes *KIN3* expression induced by MMS (0.01%), cisplatin (170  $\mu$ M), doxorubicin (9  $\mu$ M) or HN2 (25  $\mu$ M) in wild type cells by semi-quantitative RT-PCR measure. the upper row shows the expression of *KIN3* and the lower row shows the expression of *ACT1* (constitutive control).

on a FACS Calibur flow cytometer (BD PharMingen) using the CellQuest program suite. The cell cycle profile after treatment was also verified by yeast morphology analysed by optical microscopy: about 200-300 cells were counted at each time point with a hemocytometer after sonication and the distribution of cells in G<sub>1</sub>, S and G<sub>2</sub>/M was analyzed by monitoring the fraction of cells that presented no, small or large buds (not shown).<sup>57,61</sup> Cell concentration at each time point was checked by measuring the optical density (O.D. 600 nm) in a Spectramax (Molecular Devices).<sup>57</sup> All analyses were performed at least three times.

**Identification of DNA fragmentation by alkaline gel electrophoresis.** After treatments, cells were harvested and DNA was immediately extracted as Sambrook et al.<sup>54</sup> The alkaline gel electrophoresis was performed as described by Douki et al.<sup>62</sup> with minor changes. Prior to being loaded on a 2 % alkaline agarose gel, 300 µg of DNA samples were denatured for 20 min at room temperature by adding of 10 µL of 100 mM NaOH and 4 mM EDTA and 10 µL of denaturing gel loading buffer (50 % glycerol, 1 M NaOH, and 0.2 % bromophenol blue). Electrophoresis was carried out overnight at 1.3 V/cm at room temperature. The DNA samples were stained with ethidium bromide and the image captured under UV light.

**β-galactosidase assay.** The pMELβ2 plasmid (Euroscarf), containing a gene fusion of the upstream non-coding KIN3 region, was used to quantify KIN3 expression under mutagenic stress. First, a 1.1-kb EcoRI - XhoI DNA fragment containing 1,100 bp of DNA upstream of the KIN3 translation start site was subcloned into the pCR2.1 plasmid (Invitrogen). The resulting plasmid construct was cleaved with EcoRI and XhoI, gel-purified and cloned into EcoRI-XhoI-cut pMELβ2. This generated a plasmid that contained a KIN3 upstream region fusion with the lacZ gene from *E. coli*. The BY4741 wild type yeast transformation was performed using the lithium acetate method.<sup>52</sup> Cells were grown overnight in SynCo-Ura media, resuspended in the same medium and treated with MMS (0.01 %), cisplatin (170 µM), doxorubicin (9 µM) or HN2 (25 µM), in a rotary shaker at 30 °C in the dark. At different time points, cells were harvested, washed and resuspended in Z-buffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 60 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 40 mM; KCl, 10 mM; MgSO<sub>4</sub>, 1 mM; β-mercaptoetanol, 50mM). The β-galactosidase activity was determined using o-nitrophenol-β-D-galactosidase as a substrate according to Burke et al.<sup>53</sup> and activity was expressed as units of β-galactosidase per cell survival. Assays were performed in triplicate.

**Semi-quantitative RT-PCR.** The BY4741 wild type strain was treated as described in β-galactosidase assay. After 60, 90 and 120 min, cells were harvested for total RNA extraction using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Equal amounts of total RNA (1.0 µg) previously

treated with DNase I (Promega) were subjected to first strand cDNA synthesis using a poly-T antisense primer and M-MLV reverse transcriptase (Promega). PCR was carried out with Taq DNA polymerase using the first strand cDNA and specific primers for KIN3 (5'-ATGAACAAGTAGACGGTCACGAGG AAG-3' and 5'-GAGATTTGGCTAACCCAAAATCACCTA-3') or ACT1 (actin, constitutive control) (5'-ATGGAAGATGGA GCCAAAGC-3' and 5'-TCTGCCGGTATTGACCAAAC-3'). Both fragments were amplified with the same PCR program (one step of 94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s/53 °C for 30 s/72 °C for 30 s, and a last elongation step of 72 °C for 5 min). The sizes of the fragments generated were 138 bp (with KIN3 primers) and 164 bp (with ACT1 primers). Semi-quantitative RT-PCR was performed three times with RNA samples extracted on different days.

**Western blotting.** The BY4741 wild type strain was treated as described above, and after 120 min cells were lysed in lysis buffer [50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 % DMSO, 1 mM PMSF, plus protease inhibitors EDTA-free tablets (Roche)]. Proteins were first separated by SDS-PAGE (12 %) and then transferred to a nitrocellulose membrane using a 300 mA current for 90 min. Nitrocellulose sheets were then blocked by incubation with blocking buffer (3 % BSA and 0.05 % Tween 20 in PBS) for 2 h at room temperature. Afterwards, membranes were incubated with a polyclonal anti-Kin3p antibody (1:500) in blocking buffer for 18 h. Goat anti-rabbit IgG antibody conjugated to peroxidase (Santa Cruz Biotechnology), diluted 1:3000, was used as a secondary antibody. The protein Sui3, which corresponds to the β subunit of the translation initiation factor eIF2, was used as a constitutive control. Assays were performed in triplicate.

**Drop test.** Exponential cultures were serially diluted by 1:10 steps and 10 µL aliquots then spotted onto rich media plates with or without MMS (0.005 %), cisplatin (85 µM), doxorubicin (4.5 µM) or HN2 (12.5 µM) plus caffeine (10 mM). After, the plates were incubated for 2 days at 30 °C. Survival data represent the average of at least three experiments.

**Data analysis.** Data are expressed as means and standard deviations from three independent experiments and were statistically analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's Multiple Comparison Test.

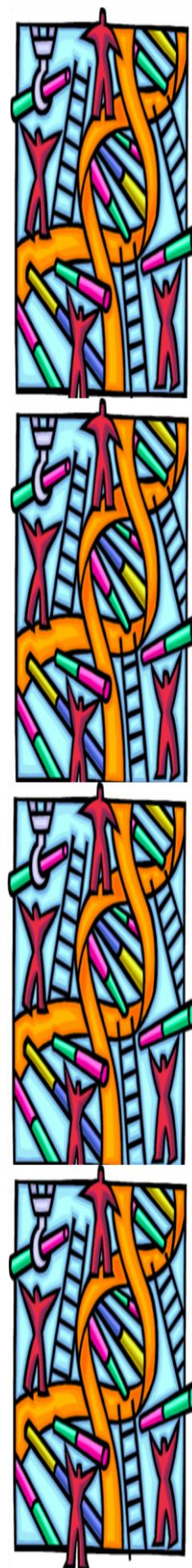
#### Acknowledgments

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

#### References

1. Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:297-308.
2. Jeggo PA, Löbrich M. Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. *DNA Repair (Amst)* 2006; 5:1192-8.
3. Lisby M, Barlow JH, Burgess RC, Rothstein R. Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* 2002; 118: 699-713.
4. Lisby M, Rothstein R. Localization of checkpoint and repair proteins in eukaryotes *Biochimie* 2005; 87:579-89.
5. Enserink JM, Smolka MB, Zhou H, Kolodner RD. Checkpoint proteins control morphogenetic events during DNA replication stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 2006; 175:729-41.
6. O'Connell MJ, Krien MJE, Hunter T. Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol* 2003; 13:221-8.
7. Osmani SA, Engle DB, Doonan JH, Morris NR. Spindle formation and chromatin condensation in cells blocked at interphase by mutation of a negative cell cycle control gene. *Cell* 1988; 52:241-51.
8. Osmani AH, McGuire SL, Osmani SA. Parallel activation of the NIMA and p34cdc2 cell cycle regulated protein kinases is required to initiate mitosis in *A. nidulans*. *Cell* 1991; 67:283-91.

9. Osmani AH, O'Donnell K, Pu RT, Osmani SA. Activation of the nimA protein kinase plays a unique role during mitosis that cannot be bypassed by absence of the bimE checkpoint. *EMBO J* 1991; 10:2669-79.
10. Pu RT, Xu G, Wu L, Vierula J, O'Donnell K, Ye XS, Osmani SA. Isolation of a functional homolog of the cell cycle specific NIMA protein kinase of *Aspergillus nidulans* and functional analysis of conserved residues. *J Biol Chem* 1995; 270:18110-6.
11. Krien MJ, Bugg SJ, Palatsides M, Asouline G, Morimyo M, O'Connell MJ. A NIMA homologue promotes chromatin condensation in fission yeast. *J Cell Sci* 1998; 111:967-76.
12. Bradley BA, Quarmby LM. A NIMA-related kinase, Cnk2p, regulates both flagellar length and cell size in *Chlamydomonas*. *J Cell Sci* 2005; 118:3317-26.
13. Grallert A, Hagan IM. Schizosaccharomyces pombe NIMA-related kinase, Fin1, regulates spindle formation and an affinity of Polo for the SPB. *EMBO J* 2002; 21:3096-107.
14. Jones DG, Rosamond J. Isolation of a novel protein kinase-encoding gene from yeast by oligodeoxyribonucleotide probing. *Gene* 1990; 90:87-92.
15. Mahjoub MR, Rasi MQ, Quarmby LM. A NIMA-related kinase, Fa2p, localizes to a novel site in the proximal cilia of *Chlamydomonas* and mouse kidney cells. *Mol Biol Cell* 2004; 15:1572-86.
16. Oregan L, Blot J, Fry AM. Mitotic regulation by NIMA-related kinases. *Cell Div* 2007; 2:1-12.
17. Chen Y, Chen PL, Chen CF, Jiang X, Riley DJ. Never-in-mitosis related kinase 1 functions in DNA damage response and checkpoint control. *Cell Cycle* 2008; 7:3194-201.
18. Hayward DG, Fry AM. Nek2 kinase in chromosome instability and cancer. *Cancer Lett* 2006; 237:155-66.
19. Lee MY, Kim HJ, Kim MA, Jee HJ, Kim AJ, Bae YS, Park JI, Chung JH, Yun J. Nek6 is involved in G2/M phase cell cycle arrest through DNA damage-induced phosphorylation. *Cell Cycle* 2008; 7:2705-9.
20. Noguchi K, Fukazawa H, Murakami Y, Uehara Y. Nek11, a new member of the NIMA family of kinases, involved in DNA replication and genotoxic stress responses. *J Biol Chem* 2002; 277:39655-65.
21. Noguchi K, Fukazawa H, Murakami Y, Uehara Y. Nucleolar Nek11 is a novel target of Nek2A in G1/S-arrested cells. *J Biol Chem* 2004; 279:32716-27.
22. Polci R, Peng A, Chen PL, Riley DJ, Chen Y. NIMA-related protein kinase 1 is involved early in the ionizing radiation-induced DNA damage response. *Cancer Res* 2004; 64:8800-3.
23. Barton AB, Davies CJ, Hutchison CA, Kaback DB. Cloning of chromosome I DNA from *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the FUN52 gene, whose product has homology to protein kinases. *Gene* 1992; 117:137-40.
24. Schweitzer B, Philippsen P. NPK1, a nonessential protein kinase gene in *Saccharomyces cerevisiae* with similarity to *Aspergillus nidulans* nimA. *Mol Gen Genet* 1992; 234:164-7.
25. Chen Y, Riley DJ, Zheng L, Chen PL, Lee WH. Phosphorylation of the mitotic regulator protein Hec1 by Nek2 kinase is essential for faithful chromosome segregation. *J Biol Chem* 2002; 277:49408-16.
26. Melixetian M, Klein DK, Sørensen CS, Helin K. NEK11 regulates CDC25A degradation and the IR-induced G2/M checkpoint. *Nat Cell Biol* 2009; 11:1247-53.
27. McHugh PJ, Sones WR, Hartley JA. Repair of intermediate structures produced at DNA interstrand cross-links in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 2000; 20:3425-33.
28. Barbour L, Ball LG, Zhang K, Xiao W. DNA damage checkpoints are involved in postreplication repair. *Genetics* 2006; 174:1789-800.
29. Fasullo M, Dong Z, Sun M, Zeng L. *Saccharomyces cerevisiae* RAD53 (CHK2) but not CHK1 is required for double-strand break-initiated SCE and DNA damage-associated SCE after exposure to X rays and chemical agents. *DNA Repair (Amst)* 2005; 4:1240-51.
30. Fassullo M, Zeng L, Giallanza P. Enhanced stimulation of chromosomal translocations by radiomimetic DNA damaging agents and camptothecin in *Saccharomyces cerevisiae* rad9 checkpoint mutants. *Mutat Res* 2004; 547:123-32.
31. Grossmann KF, Brown JC, Moses RE. Cisplatin DNA cross-links do not inhibit S-phase and cause only a G2/M arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*. 1999; 434:29-39.
32. Rouse J, Jackson SP. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* 2002; 297:547-51.
33. Kupiec M, Simchen G. Arrest of the mitotic cell cycle and of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* by MMS. *Mol Gen Genet* 1985; 201:558-64.
34. Carrozza MJ, Stefanick DF, Horton JK, Kedar PS, Wilson SH. PARP inhibition during alkylation-induced genotoxic stress signals a cell cycle checkpoint response mediated by ATM. *DNA Repair* 2009; 8:1264-72.
35. Blanco MG, Matos J, Rass U, Ip SC, West SC. Functional overlap between the structure-specific nucleases Yen1 and Mus81-Mms4 for DNA-damage repair in *S. cerevisiae*. *DNA Repair* 2010. In press.
36. Yang X, Wood PA, Hrushesky WJ. Mammalian TIMELESS is required for ATM-dependent Chk2 activation and G2/M checkpoint control. *J Biol Chem* 2009; 7.
37. Grossmann KF, Ward AM, Matkovic ME, Foliass AE, Moses RE. *Saccharomyces cerevisiae* has three pathways for DNA interstrand crosslink repair. *Mutat Res* 2001; 487:73-83.
38. Coldwell KE, Cutts SM, Ognibene TJ, Henderson PT, Phillips DR. Detection of Adriamycin-DNA adducts by accelerator mass spectrometry at clinically relevant Adriamycin concentrations. *Nucleic Acids Res* 2008; 36:e100.
39. Frankenberg-Schwager M, Kirchermeier D, Greif G, Baer K, Becker M, Frankenberg D. Cisplatin-mediated DNA double-strand breaks in replicating but not in quiescent cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology* 2005; 212:175-84.
40. Lundin C, North M, Erixon K, Walters K, Jenssen D, Goldman ASH, Helleday T. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable *in vivo* DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:3799-811.
41. Spencer DMS, Bilardi RA, Koch TH, Post GC, Nafieb JW, Kimura KI, Cutts SM, Phillips DR. DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: A role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. *Mutat Res* 2008; 638:110-121.
42. Wyatt MD, Pittman DL. Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol* 2006; 19:1580-94.
43. Sutherland BM, Bennett PV, Sutherland JC. *Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols*, ed. Henderson, D. (Humana, Totowa NJ), pp. 183-202.
44. Sutherland BM, Bennett PV, Sidorkina O, Laval J. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. *PNAS* 2000; 97:103-8.
45. Basehoar AD, Zanton SJ, Pugh BF. Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell* 2004; 116:699-709.
46. Rouse J, Jackson SP. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* 2002; 297:547-51.
47. Löffler H, Bochtler T, Fritz B, Tews B, Ho AD, Lukas J, Bartek J, Krämer A. DNA Damage-Induced Accumulation of Centrosomal Chk1 Contributes to its Checkpoint Function. *Cell Cycle* 2007; 6:2541-2548.
48. Vaze MB, Pelliccioli A, Lee SE, Ira G, Liberi G, Arbel-Eden A, Foiani M, Haber JE. Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase. *Mol Cell* 2002; 10:373-85.
49. McHugh PJ, Gill RD, Waters R, Hartley JA. Excision repair of nitrogen mustard-DNA adducts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 1999; 27:3259-66.
50. Beljanski V, Marzilli LG, Doetsch PW. DNA damage-processing pathways involved in the eukaryotic cellular response to anticancer DNA cross-linking drugs. *Mol Pharmacol* 2004; 65:1496-506.
51. Lehoczky P, McHugh PJ, Chovanec M. DNA interstrand crosslink repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 2007; 31:109-33.
52. Sasaki MS, Takata M, Sonoda E, Tachibana A, Takeda S. Recombination repair pathway in the maintenance of chromosomal integrity against DNA interstrand crosslinks. *Cytogenet Genome Res* 2004; 104:28-34.
53. Li X, HeyerWD. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 2008; 18:99-113.
54. Surpili MJ, Delben TM, Kobarg J. Identification of proteins that interact with the central coiled-coil region of the human protein kinase NEK1. *Biochemistry* 2003; 42:15369-76.
55. Simon JA, Bedalov A. Yeast as a model system for anticancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:481-92.
56. Gietz RD, Woods RA. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 2002; 350:87-96.
57. Burke D, Dawson D, Stearns T. *Methods in Yeast Genetics a Cold Spring Harbour Laboratory Course Manual*. New York, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2000.
58. Sambrook J, Fritsch ER, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
59. Whelan WL, Gocke E, Manney TR. The CAN1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*: fine-structure analysis and forward mutation rates. *Genetics* 1979; 91:35-51.
60. Eckardt F, Haynes RH. Quantitative measures of mutagenicity and mutability based on mutant yield data. *Mutat Res* 1980; 74:439-458.
61. Cardone JM, Revers LF, Machado RM, Bonatto D, Brendel M, Henriques, JAP. Psoralen-sensitive mutant pso9-1 of *Saccharomyces cerevisiae* contains a mutant allele of the DNA damage checkpoint gene MEC3. *DNA Repair* 2006; 5:163-71.
62. Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet J, Sage E. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry* 2003; 42:9221-6.



## CAPÍTULO II

**The NIMA-related kinase Kin3p interacts with the MRX complex in *Saccharomyces cerevisiae***

**Artigo submetido ao periódico DNA Repair**

(Os resultados apresentados nas Figuras 3, 4, 5 e 6 foram obtidos em conjunto com a pesquisadora Jaqueline Cesar Rocha e também constam na dissertação de mestrado, pelo PPGBCM, de autoria da mesma)

**The NIMA-related kinase Kin3p interacts with the MRX complex in *Saccharomyces cerevisiae***

Dinara Jaqueline Moura<sup>1</sup>, Jaqueline Cesar Rocha<sup>1</sup>, Bruna Frielink Immich<sup>1</sup>, Bruna Castilhos<sup>1</sup>, Jacqueline Moraes Cardone<sup>1</sup>, João Antonio Pêgas Henriques<sup>1,2</sup>, Guido Lenz<sup>1</sup>, Jenifer Saffi<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biophysics/Biotechnology Center, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Biotechnology Center, Caxias do Sul University (UCS), Caxias do Sul, RS, Brazil

<sup>3</sup> Department of Basic Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil

\* Correspondence to: Jenifer Saffi; Department of Basic Health Sciences – Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Av. Sarmiento Leite, 245/308. CEP 90050-170; Porto Alegre-RS, Brazil. Tel: 33003 8752.

E-mail address: jenifers@ufcspa.edu.br.

## Abstract

The Kin3 protein is a structural homolog of NIMA of *Aspergillus nidulans*, a mitotic regulator with a pivotal role in controlling the G2-M transition. Several NIMA-related kinases (Nrk) were identified in different species and appear to be involved in diverse processes, including the DNA damage response. Nek1, a mammalian NIMA related kinase, acts at the G2/M-phase checkpoint during the DNA damage response and interacts with the protein Mre11 *in vitro*. Our previous results showed that the Kin3 protein can be involved in DNA strand-break recognition, thereby mediating G2 cell cycle arrest, as *kin3Δ* cells fail to arrest properly at G2/M phase checkpoints in response to DNA adduct damage. In this work, we evaluated the interaction of the Kin3 protein with each subunit of the MRX complex, which is involved in DNA damage sensing, signaling and repair mechanisms, as well as in the maintenance of chromosomal integrity in the cell. Here we show that the Kin3 protein interacts with each protein of the MRX complex using a two-hybrid assay. These results were confirmed by the epistasis shown between *KIN3* and MRX in the sensitivity to cisplatin, nitrogen mustard and photo-activated 8-methoxypsoralen. Whereas *KIN3* gene expression was upregulated in the wild type strain after mutagenic stress, no significant differences were observed in MRX mutant strains under the same conditions, suggesting that Kin3 might be activated prior to MRX complex formation.

Keywords: Kin3, DNA damage, MRX complex, NIMA-related kinases, *Saccharomyces cerevisiae*

## 1. Introduction

The *KIN3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* was isolated in early 1990 from a library of cloned genomic fragments by probing with an oligodeoxyribonucleotide mixture corresponding to part of a highly-conserved region in the catalytic domain of protein serine-threonine kinases [1]. The Kin3 protein is a yeast ortholog of NIMA (never in mitosis A) in *Aspergillus nidulans*, displaying 45.9% identity in the protein kinase domain [2], and its absence does not affect growth, mating or sporulation [1-3].

We have recently uncovered a role for the Kin3 protein in DNA damage response by showing that *KIN3* deficient yeast cells are more sensitive to the effects of DNA adducts induced by methyl methane sulfonate (MMS), cisplatin, doxorubicin and nitrogen mustard (HN2) than is its isogenic wild-type strain [4]. The expression level of the *KIN3* gene and its protein is upregulated after genotoxic stress. Moreover, in this work we suggested that the Kin3 protein can be involved in DNA strand-break recognition, thereby mediating G2 cell cycle arrest, as *kin3Δ* cells fail to arrest properly at G2/M phase checkpoints in response to DNA adduct damage, and this happens in a Tel1/Mec1-dependent pathway [4].

NIMA is a cell cycle-regulated protein kinase required for the initiation of mitosis in *A. nidulans* [5-7]. Protein kinases that are structurally related to fungal NIMA were isolated from various organisms [8,9], and mammalian NIMA-related kinases (Nrks or Neks) have been recently better characterized. Among these cell cycle-regulated protein kinases, Nek1, Nek2, Nek6 and Nek11 have been associated with the DNA damage response. Whereas Nek2 and Nek6 appear to promote mitotic entry after DNA damage, Nek1 and Nek11 are important for efficient DNA damage checkpoint control [10-15]. In a similar manner to the *S. cerevisiae* Kin3 protein, Nek1 and Nek11 are required for DNA



damage-induced G2/M arrest. Moreover, Nek1-deficient cells show sensitivity to different types of DNA damage [15].

The Nek1 protein was the first mammalian NIMA ortholog to be identified and is involved in the DNA damage response to multiple agents [11, 15-17]. Its deficiency induces defects in the G1/S and G2/M-phase checkpoints during the DNA damage response, failing to activate downstream mediators such as Chk1 and Chk2 [11]. Furthermore, experiments using a two-hybrid screen report that NEK1 interacts with proteins involved in double-strand DNA (dsDNA) break repair at the G2/M transition phase of the cell cycle, in neural cell developmental stages and in polycystic kidney disease (PKD) [18]. The proteins involved in DNA repair include Mre11, 53BP1 and ATRX.

The Mre11 protein is part of the MRX complex, together with the Rad50 and Nbs1 (Xrs2 in yeast) proteins. The MRX complex acts to maintain genome stability by functioning in DNA damage sensing, signaling and repair mechanisms, as well as maintaining chromosomal integrity in the cell [19]. This complex is necessary for the phosphorylation and activation of both Chk1 and Chk2 (Rad53 in yeast) checkpoint kinases on ATM (Tel1 in yeast)-dependent checkpoint pathway [20, 21]. In *S. cerevisiae*, Mre11 is phosphorylated in a Tel1p-dependent manner in response to DNA damage, indicating that the MRX complex functions as a sensor and a signal transducer for DNA damage.

In response to DNA damage, a number of DNA checkpoint and repair proteins are activated. DNA lesions that put the genomic integrity at risk activate signal transduction pathways and DNA damage checkpoints. Once DNA lesions are detected, full activation of these pathways leads to the transcriptional activation of the DNA damage response,

temporary cell cycle arrest and activation of DNA repair [22-24]. Thus far, Kin3 and the mammalian NIMA-related protein associated with DNA damage do not fit into any of the known DNA damage response pathways completely. Taking into account that the phenotype of Kin3-deficient cells is rather similar to Nek1-deficient cells and that the MRX complex is highly conserved, it is likely that these proteins may play roles in the same pathway in response to DNA damage in *S. cerevisiae*. To confirm our hypothesis, we analyzed whether Kin3 associates with each MRX complex subunit using genetical and biochemical interaction assays. Here we show that Kin3 interacts with the Mre11, Rad50 and Xrs2 proteins to preserve genome integrity and cell viability in the presence of DNA adduct damage.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Two-hybrid KIN3 protein-MRX protein interaction assay

Protein interaction experiments were carried out employing the Matchmaker GAL4, Yeast Two-Hybrid System-3 (YTHS) (Clontech). Briefly, *S. cerevisiae* Y187 cells were co-transformed with pGBKT7-*KIN3* and the activation domain constructs pGADT7-*MRE11*, pGADT7-*RAD50* or pGADT7-*XRS2*. pGBKT-7 and pGADT-7 plasmids expressed the gene of interest as GAL4 fusions with the c-Myc epitope (c-Myc) and hemagglutinin epitope (HA) tags, respectively. To clone the genes in-frame with GAL4BD or GAL4AD, we performed PCRs of the genomic DNAs using gene specific primers flanked by *NcoI* and *BamHI* restriction sites [*KIN3N* (5'-CCATGGAATGCATAGACGACAGTTTTT-3'), *KIN3C* (5'-GGATCCGTTATCGATATCTTGTTTGCC-3'), *MRE11N* (5'-CCATGGAATGGACTATCCTGATCCAG-3'), *MRE11C* (5'-

GGATCCGAGGGATCAAGTACAACACTATT-3'), *RAD50N* (5'-  
 CCATGGATGAGCGCTATCTATAAATT-3'), *RAD50C* (5'-  
 GGATCCGTCAATAAGTGACTCTGTAA-3'), *XRS2N* (5'-  
 CCATGGAATGTGGGTAGTACGATACC-3') and *XRS2C* (5'-

GGATCCGACCTGTAGTGCTTCTTTAAA-3') and a high-fidelity thermostable DNA polymerase (Platinum® Taq, Invitrogen). Deletion of the C-terminal region of *KIN3* gene used in YTHS was obtained by PCR using the primer *KIN3-1032C* (5'-GGATCCGTCGTATCTGAATATCTTGCA-3') to delete the last 92 C-terminal amino acids (aa). This C-terminal portion was chosen to be deleted as it is not part of the kinase domain (*Saccharomyces* Genome Database). Protein kinases homologous to NIMA have been described that contain about 40% identity at their N-terminal catalytic domains, but almost no identity at their C-terminal domain. The C-terminal domains are their regulatory domains and might be involved in determining their specificity for substrate(s) or interactions with other proteins [18]. The in-frame and accurate sequence of baits and preys were confirmed by sequencing. Transformants were seeded on appropriate selective media and subsequently assayed for activation of the reporter gene on X- $\alpha$ -Gal plates. The interactions were quantitatively tested for  $\beta$ -galactosidase activity according to Burke et al. [25].

## 2.2. Co-Immunoprecipitation

The Y187 transformants containing pGBKT7-*KIN3* and the activation domain constructs pGADT7-*MRE11*, pGADT7-*RAD50* or pGADT7-*XRS2*, were grown overnight in liquid on synthetic complete medium - SynCo (containing 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% ammonium sulfate and 2% glucose) supplemented with the

appropriate amino acids and bases [25]. Then, the cells were washed three times in ice-cold PBS and lysed in lysis buffer [50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% DMSO, 1 mM PMSF, plus protease inhibitors (EDTA-free tablets, Roche)]. The cell supernatants were incubated with protein A Sepharose and anti-HA monoclonal antibody (previously mixed) for 2 h agitation at 4°C. The sepharose-bound immune complexes were collected by centrifugation (3 min; 2500 rpm; 4°C). The resulting pellets were washed two times with lysis buffer before the antigens were released by heating at 95°C for 5 min. Western blots were performed as described in Moura et al. [4] and probed with the anti-c-Myc monoclonal antibody.

### 2.3. Strains and Media

The *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1. The yeast double mutants were constructed using a *kin3Δ::URA3* disruption cassette that had been amplified from the YCPLac33 plasmid by PCR using specific primers [*kin3::URA3S* (5'-ATGCATAGACGACAGTTTTTCCAAGAATACCGTAGTCCTCTTATAATACAGTTTTTTAGT-3') and *kin3::URA3A* (5'-TTATCGATATCTTGTTTGCCAGTGGTATGCAGGTTTGGCAATACTCTTCCTTTTCAATA -3')] and a high fidelity thermostable DNA polymerase (Platinum® Taq, Invitrogen). The single mutants were transformed using the lithium acetate method [26] and the linear disruption construct described above. Transformants were selected by growth on SynCo-Ura media, and the disruption was verified by genomic PCR using internal *KIN3* primers (*KIN3S* 5'-ATGAACAAGTAGACGGTCACGAGGAAG-3' and *KIN3A* 5'-GAGATTTGGCTAACCCAAAATCACCTA-3'). The *Escherichia coli* strain XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1lac [F' proAB lacIqZ.M15*

*Tn10 (Tetr)*- Stratagene, USA) was used for plasmid manipulation and propagation. DNA fragments of interest were sub-cloned into the pCR<sup>®</sup>2.1 vector (Invitrogen). Yeast media were prepared and the bacterial genetic procedures were performed as described by Burke et al. [25] and Sambrook et al. [27], respectively. A complete medium (YPD) containing 0.5% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose was used for routine yeast growth. Auxotrophy markers were controlled on SynCo medium lacking the appropriate nutrients. For use on plates, the medium was solidified with 2% bacto-agar.

**Table 1.** *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Euroscarf
<i>kin3Δ</i>	BY4741; <i>kin3::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>mre11Δ</i>	BY4741; <i>mre11::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>rad50Δ</i>	BY4741; <i>rad50::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>xrs2Δ</i>	BY4741; <i>xrs2::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>mre11Δkin3Δ</i>	<i>mre11Δ; kin3::URA3</i>	This work
<i>rad50Δkin3Δ</i>	<i>rad50Δ; kin3::URA3</i>	This work
<i>xrs2Δkin3Δ</i>	<i>xrs2Δ; kin3::URA3</i>	This work
Y187	<i>MATa ura3-52 his3-200 ade2-101 trp1-901 leu2-3112 gal4Δ met- gal80Δ URA3::GALIUS-GALITATA-lacZ</i>	Clontech

#### 2.4. Mutagen treatment and survival assays

Stationary phase cultures were obtained by inoculating an isolated colony into liquid YPD. After 48 hours, the cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS pH 7.4) and re-suspended in the same buffer to a titer of  $2 \times 10^8$  cells/mL. To evaluate the sensitivity for different mutagens, the cells were treated with either cisplatin at concentrations from 50 to 900  $\mu\text{g}/\text{mL}$  or HN2 at concentrations ranging from 50 to 800  $\mu\text{M}$  for 1 h in a rotary shaker at 30 °C in the dark. After treatment, the cells were appropriately diluted and plated in triplicate on solid medium. To evaluate the photo-activated 8-methoxypsoralen (8-MOP) sensitivity, the cells were incubated at a

concentration of 5  $\mu\text{M}$  for 30 min at 4 °C in the dark, and after appropriate dilution, plated on solid medium and exposed to increasing doses of UVA light (dose range from 0 to 2.0  $\text{kJ}/\text{m}^2$  - Stratalinker, Stratagene, USA). After treatment, the plates were incubated at 30 °C for 2-3 days before the colonies were counted. The data presented represent the average of at least three independent experiments, each carried out in triplicate.

### 2.5. *Mutagenesis evaluation*

Forward mutation was measured using the canavanine resistance assay (*CANI*→*canI<sup>R</sup>*) after induction with cisplatin, HN2 or 8-MOP. The cells were plated onto SC plates lacking arginine and supplemented with canavanine (60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The plates were incubated in the dark for 3-5 days before the colonies were counted. The frequency of mutation was scored relative to the number of surviving cells. The experiments were carried out in triplicate, and the data represent the average of at least three independent experiments.

### 2.6. *Cell cycle profile*

The cell cycle profile was verified after treatment by analyzing the yeast morphology using optical microscopy in accordance to Burke et al. [25]. Cells were synchronized in the G1-phase by resuspending exponential phase cultures ( $5 \times 10^6$  cells/mL) in fresh YPD with 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of the yeast pheromone  $\alpha$ -factor (Sigma) for 2 hours. After microscopic confirmation of growth arrest,  $1 \times 10^7$  cells were washed with PBS, resuspended in SynCo medium and treated with cisplatin, as previously described, in a rotary shaker at 30 °C in the dark. Approximately 200-300 cells were counted at each time point with a hemocytometer after sonication, and the distribution of cells in the G1, S and

G2/M phases was analyzed by monitoring the fraction of cells that presented no, small or large buds. Large-budded cells were defined as those in which the bud was >50% of the size of the mother cell [25,28].

### 2.7. Semi-quantitative RT-PCR

After 60 min of mutagenic treatment, the cells were harvested for total RNA extraction using the RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Equal amounts of total RNA (1.0 µg) previously treated with DNase I (Promega) were subjected to first strand cDNA synthesis using a poly-T antisense primer and M-MLV reverse transcriptase (Promega). PCR was carried out with *Taq* DNA polymerase using the first strand cDNA and specific primers for *KIN3* (5'-ATGAACAAGTAGACGGTCACGAGGAAG-3' and 5'-GAGATTTGGCTAACCCAAAATCACCTA-3') or *ACT1* (actin, constitutive control) (5'-ATGGAAGATGGAGCCAAAGC-3' and 5'-TCTGCCGGTATTGACCAAAC-3'). Both fragments were amplified using the same PCR program (one step of 94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s/53 °C for 30 s/72 °C for 30 s, and a final elongation step of 72 °C for 5 min). The sizes of the fragments generated were 138 bp (with *KIN3* primers) and 164 bp (with *ACT1* primers). Semi-quantitative RT-PCR was performed three times with RNA samples extracted on different days.

## 3. Results

### 3.1. *Kin3* interacts with *MRX* complex proteins

Recently, Kin3 has been demonstrated to be a novel yeast DNA damage response protein important to proper checkpoint and DNA repair following exposure to DNA adduct

inducers [4]. To investigate the molecular partners of this protein, we performed a two-hybrid assay using the Kin3 protein as bait and each protein of the MRX complex as prey. The MRX complex was chosen because it is involved in several aspects of the cellular DNA damage response including DNA damage checkpoint activation [19]. The degradation of X- $\alpha$ -gal substrate in the plates, as demonstrated by the formation of blue colonies, indicates that Kin3p interacts with Mre11p, Rad50p and Xrs2p in yeast cells. These interactions were not affected by genotoxic agents that induce DNA adducts (Fig. 1A). These interactions were quantified, and the results are shown in Table 2, where an increase in beta-galactosidase activity of at least ten times can be observed in strains containing the Kin3 protein and each protein of MRX complex (when compared to strains with the empty plasmids). To test whether the C-terminal region could be responsible for the interaction, we constructed bait containing a *KIN3* C-terminal deletion lacking the last 92 aa. No significant difference in  $\beta$ -galactosidase activity was detected when the deleted bait was used rather than the unaltered Kin3 bait (Fig. 1B). The interaction between the Mre11 protein (bait) and the Xrs2 protein (prey) was used as positive interaction control (Table 2, Fig. 1). Moreover, the low activity of beta-galactosidase detected in yeast harboring the empty pGADT7 plasmid and expressing Kin3p as bait indicates that Kin3 is not able to self-activate (Table 2).



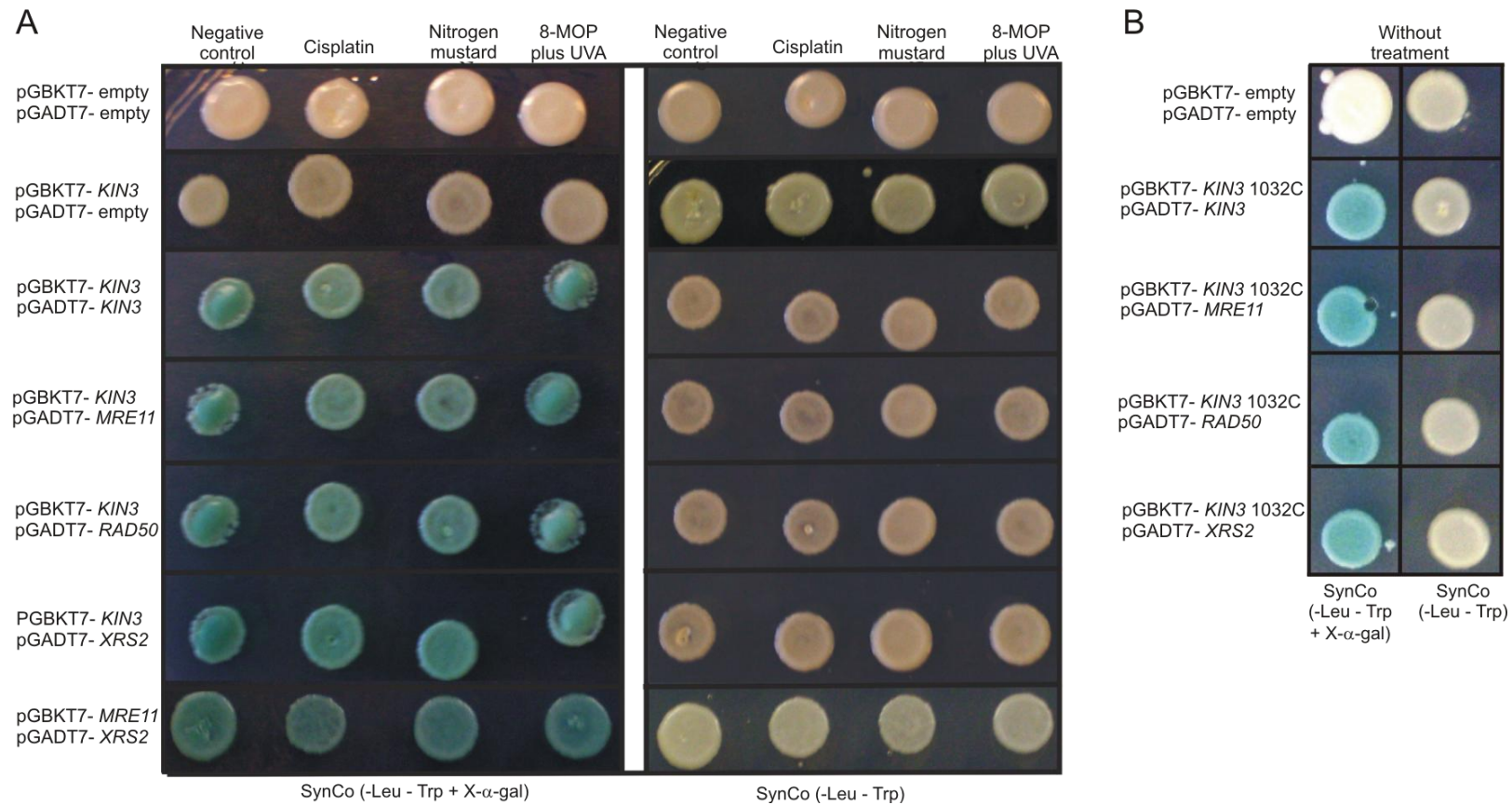


Fig. 1. A) Two-hybrid interaction assays using the Kin3 protein as bait and each protein of the MRX complex as prey. B) Two-hybrid interaction assays using the Kin3 C-terminal deletion mutant (final 92 C-terminal amino acids) as bait and each protein of the MRX complex as prey. Left: SynCo plates with X- $\alpha$ -gal substrate. Right: SynCo plates without this substrate. The blue colonies represent positive interaction between the evaluated proteins.

**Table 2.** Kin3 and MRX complex protein interaction by two-hybrid assay<sup>a</sup>.

DNA-binding domain plasmid (pGBKT7)	Activition domain plasmid (pGADT7)	β-galactosidase activity <sup>b</sup>			
		Negative control	Cisplatin	HN2	8-MOP
pGBKT7- empty	pGADT7- empty	1.2 ± 0.9	1.4 ± 0.7	1.9 ± 0.03	0.9 ± 0.1
pGBKT7- <i>KIN3</i>	pGADT7- empty	2.7 ± 1.3	1.2 ± 0.1	3.2 ± 1.2	2.7 ± 0.9
pGBKT7- <i>KIN3</i>	pGADT7- <i>MRE11</i>	34.6 ± 9.7	29.2 ± 3.7	26.5 ± 2.9	38.6 ± 4.3
pGBKT7- <i>KIN3</i>	pGADT7- <i>RAD50</i>	42.4 ± 11.8	31.8 ± 12.9	29.5 ± 3.4	41.2 ± 7.1
pGBKT7- <i>KIN3</i>	pGADT7- <i>XRS2</i>	34.3 ± 12.5	43.2 ± 5.3	37.4 ± 6.7	37.3 ± 11.7
pGBKT7- <i>MRE11</i>	pGADT7- <i>XRS2</i>	76.3 ± 19.8	69.7 ± 10.4	65.3 ± 13.7	71.0 ± 17.4

<sup>a</sup> Plasmids that directed the synthesis of the DNA-binding domain (pGBKT7) and activation domain (pGADT7) fusion proteins were introduced into Y187 yeast strain. <sup>b</sup>Expressed in Miller units per survival cells. The values are averages from three to four independent transformants each assayed in duplicate.

### 3.2. Co-immunoprecipitation

The Kin3 protein tagged with a C-Myc epitope was expressed in Y187 together with either the Mre11, Rad50 or Xrs2 proteins tagged with the HA epitope. Fig. 2 shows that C-Myc-tagged Kin3 co-immunoprecipitated with all proteins of the MRX complex. In cells transformed with the empty plasmid pGADT7, anti-HA IP did not immunoprecipitate C-Myc-tagged Kin3, Fig. 2, line 1.

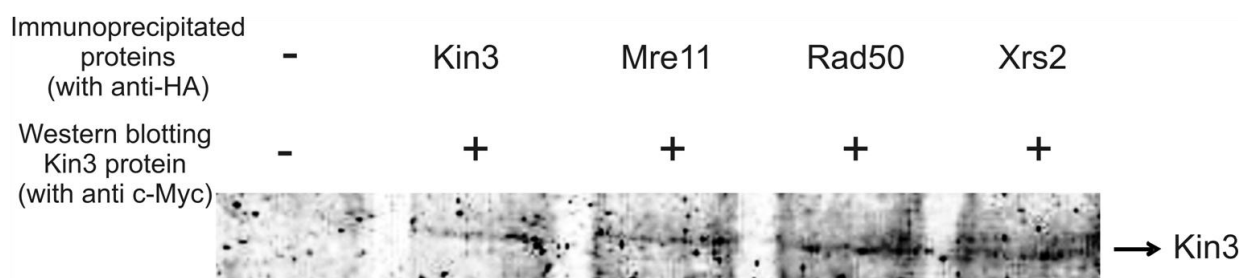
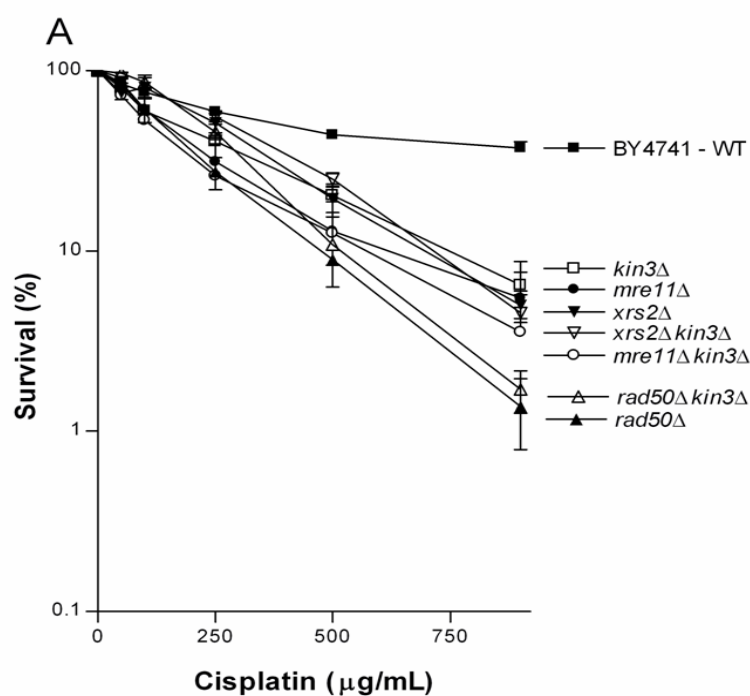


Fig. 2. Co-immunoprecipitation of the Kin3 and MRX proteins. Western blotting against an anti-cMyc antibody of proteins immunoprecipitated using an anti-HA antibody. Extracts were prepared from Y187 harboring the plasmids pGADT-7 and pGBKT-7 with various cloned genes.

### 3.3. *S. cerevisiae* double mutant interactions after genotoxic stress

To test for Kin3 and MRX interactions *in vivo*, double yeast mutants lacking these proteins were constructed. The survival rates of simple and double *S. cerevisiae* mutants were examined with increasing doses of bulky DNA adduct inducers. After cisplatin treatment, the double mutants *mre11Δkin3Δ* and *xrs2Δkin3Δ* were as sensitive as single mutants (Fig. 3A). Indeed, the *kin3Δ* allele confers sensitivity to cisplatin, although not as strongly as observed for the *rad50Δ* and *rad50Δkin3Δ* mutants (Fig. 3A). In addition, the

mutagenesis results showed that deletion of the *KIN3* gene induces a block in the rate of revertants in MRX mutants after cisplatin treatment (Fig. 3B). Nitrogen mustard (HN2) and cisplatin both bind to DNA strands forming DNA-interstrand crosslinks (ICLs) [29]. As shown in Fig. 4A, no differences were observed in the MRX mutants after *KIN3* gene deletion, and all double mutants showed the same sensitivity profile compared to the single mutants *mre11* $\Delta$ , *rad50* $\Delta$  or *xrs2* $\Delta$  during HN2 treatment. Similar results were observed during forward mutation evaluation (Fig. 4B). The observed sensitivities of the *mre11* mutant allele to cisplatin and HN2 (Fig. 3 and 4) confirm and extend the findings of McHugh et al. [30], showing that MRX alleles in *S. cerevisiae* are also sensitive to ICL inducers. Moreover, these results are in accordance with our previous results, indicating the involvement of Kin3 in response to mutagenic stress induced by cisplatin and HN2 [4]. Additionally, we showed that this protein acts in the epistatic way with the MRX complex during these responses.



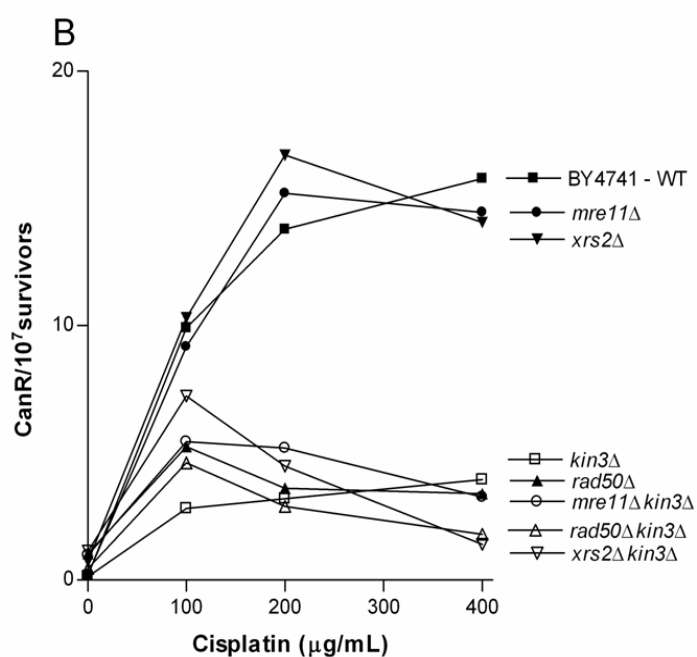
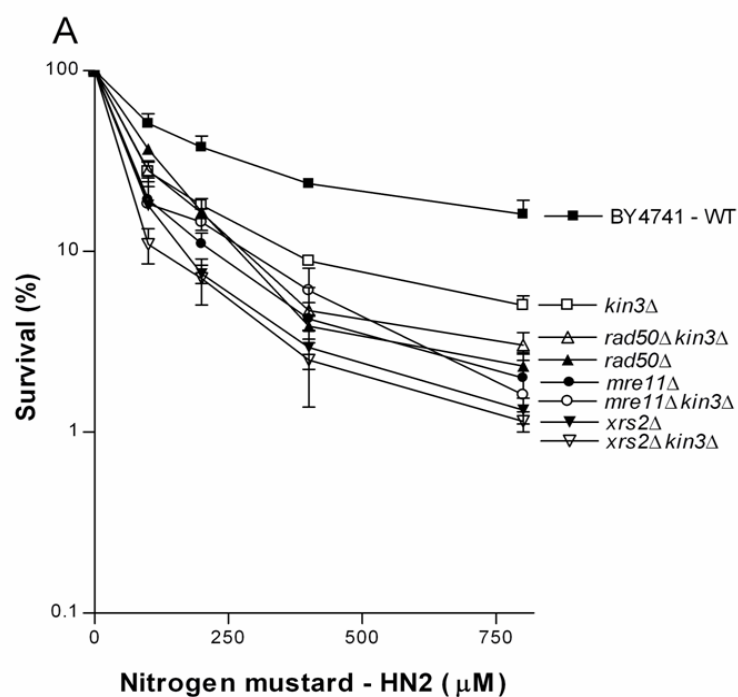


Fig. 3. (A) Sensitivity of BY4741 wild-type, single mutants (*kin3* $\Delta$ , *mre11* $\Delta$ , *rad50* $\Delta$ , *xrs2* $\Delta$ ) and double mutants (*kin3* $\Delta$ *mre11* $\Delta$ , *kin3* $\Delta$ *rad50* $\Delta$ , *kin3* $\Delta$ *xrs2* $\Delta$ ) after treatment with cisplatin. (B) Induced forward mutations in the *CAN1* locus per  $10^7$  cells. Stationary cells were treated for 1 hour with mutagen in PBS at 30 °C. The results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.



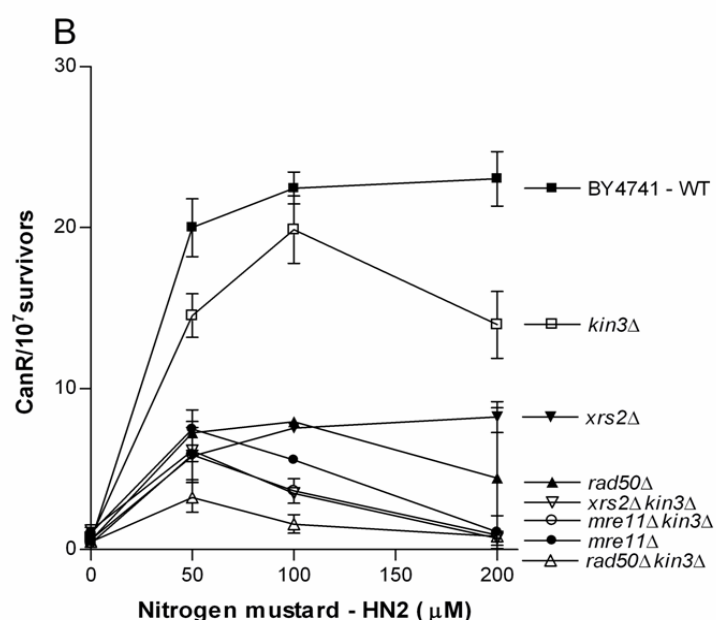


Fig. 4. (A) Sensitivity of BY4741 wild-type, single mutants (*kin3*Δ, *mre11*Δ, *rad50*Δ, *xrs2*Δ) and double mutants (*kin3*Δ*mre11*Δ, *kin3*Δ*rad50*Δ, *kin3*Δ*xrs2*Δ) after treatment with nitrogen mustard (HN2). (B) Induced forward mutations in the *CAN1* locus per 10<sup>7</sup> cells. Stationary cells were treated for 1 hour with mutagen in PBS at 30 °C. The results are expressed as the mean ± standard deviation of three independent experiments.

To confirm the involvement of these proteins in the ICL response, we also evaluated the phenotype in response to photo-activated 8-MOP. Fig. 5A shows that, after treatment with 8-MOP plus UVA, *mre11*Δ*kin3*Δ and *xrs2*Δ*kin3*Δ double mutants display a phenotype similar to the *kin3*Δ single mutant but are more sensitive than the *mre11*Δ and *xrs2*Δ single mutants. This indicates that deletion of the *KIN3* gene induces an increase in sensitivity of *mre11*Δ and *xrs2*Δ simple mutants (Fig. 5A). The double mutant *rad50*Δ*kin3*Δ shows practically the same sensitivity as the *rad50*Δ mutant (Fig. 5A). The forward mutation rate was also quite similar for the single and double mutants (Fig. 5B), but all mutant strains showed a decrease in mutation rate when compared to the WT strain.

These epistatic interactions suggest that both gene products may function in a common pathway of repair for 8-MOP-photoinduced DNA lesions.

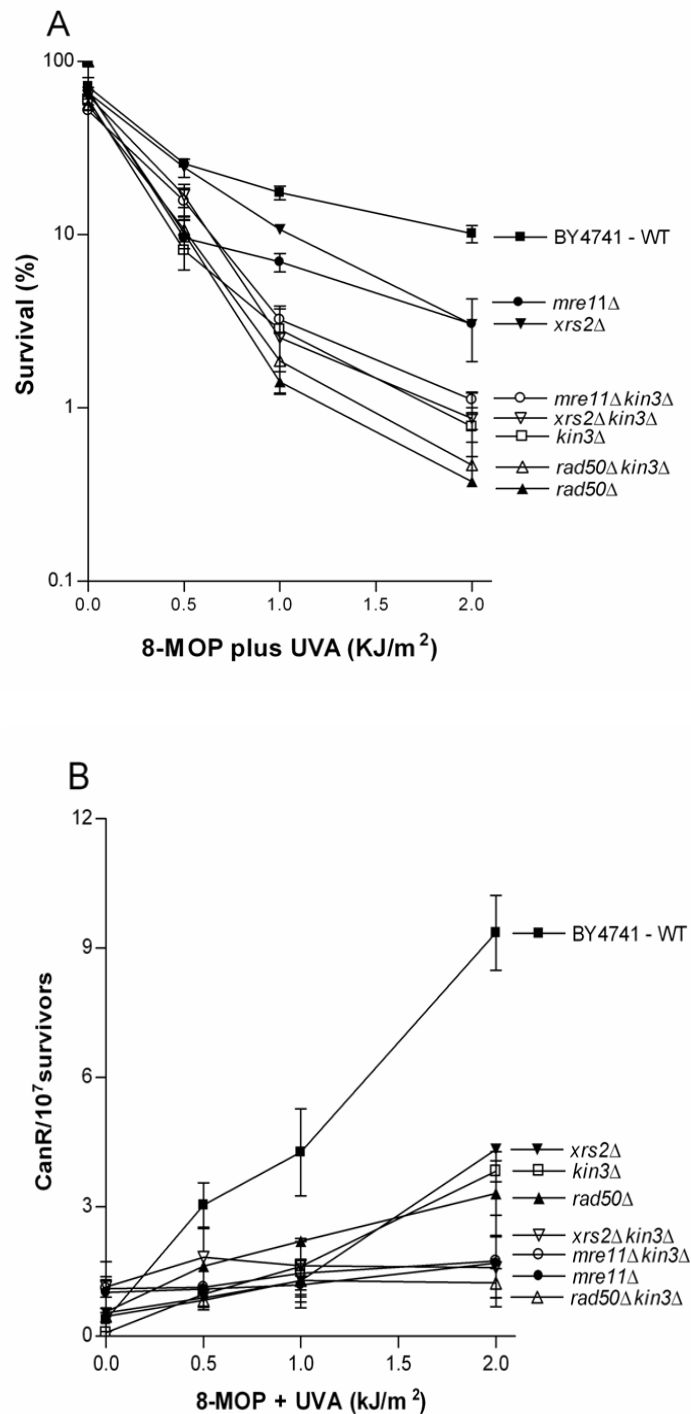
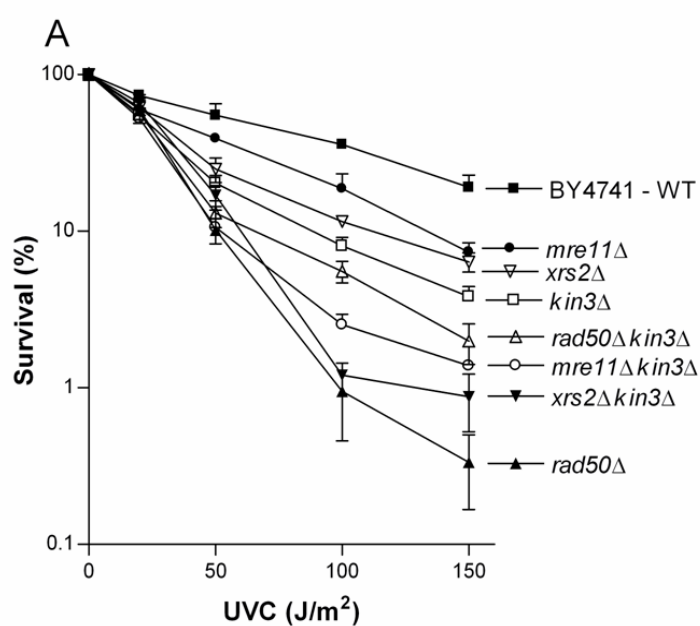


Fig. 5. (A) Sensitivity of BY4741 wild-type, single mutants (*kin3*Δ, *mre11*Δ, *rad50*Δ, *xrs2*Δ) and double mutants (*kin3*Δ*mre11*Δ, *kin3*Δ*rad50*Δ, *kin3*Δ*xrs2*Δ) after treatment with 8-MOP plus UVA. (B) Induced forward mutations in the *CAN1* locus per 10<sup>7</sup> cells.

Stationary cells were treated for 1 hour with mutagen in PBS at 30 °C. The results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

Deletion of the *KIN3* gene increases the sensitivity of *mre11* $\Delta$  and *xrs2* $\Delta$  mutants after exposure to UVC (Fig. 6A). On the other hand, the sensitivity of the *rad50* $\Delta$  mutant decreases (when combined with a *kin3* mutation) at higher radiation doses (Fig. 6A). The pronounced sensitivity observed in the *rad50* $\Delta$  strain are in disagreement with previous reports in mammalian cells, which indicate that the S-phase checkpoint response after UVC damage is independent of MRX complex [31]. During the forward mutation evaluation, all strains gave similar results, but deletion of the *KIN3* gene resulted in a slight reduction in mutation rate, compared with the WT and MRX single mutants (Fig. 6B). These differences in the sensitivity of the single and double mutants suggest that during the UVC-induced DNA damage response, the Kin3 protein can act independently of the MRX complex.





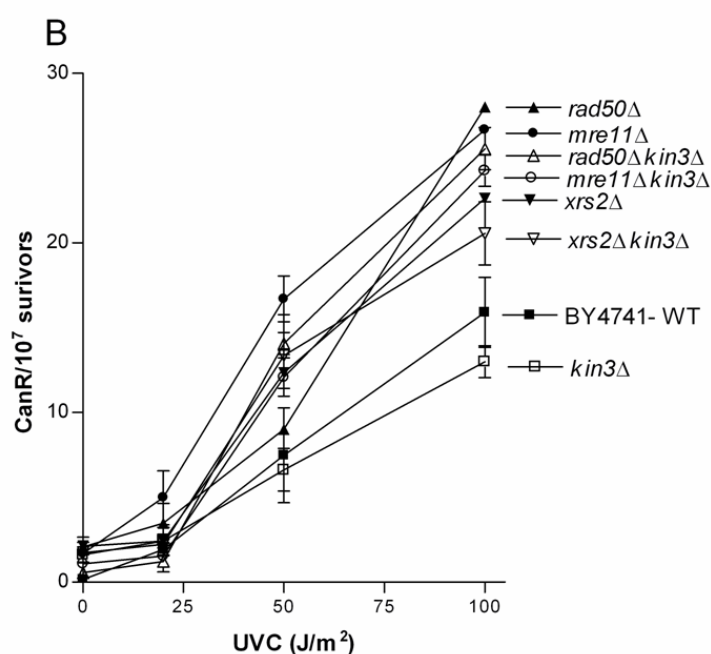


Fig. 6. (A) Sensitivity of BY4741 wild-type, single mutants (*kin3Δ*, *mre11Δ*, *rad50Δ*, *xrs2Δ*) and double mutants (*kin3Δmre11Δ*, *kin3Δrad50Δ*, *kin3Δxrs2Δ*) after treatment with UVC. (B) Induced forward mutations in the *CAN1* locus per  $10^7$  cells. Stationary cells were treated for 1 hour with mutagen in PBS at 30 °C. The results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

### 3.4. Cell cycle analysis

The MRX complex is involved in the *S. cerevisiae* checkpoint response as part of the DNA damage sensing apparatus, because *mre11Δ*, *rad50Δ* and *xrs2Δ* yeast cells are defective in S-phase and G<sub>2</sub> checkpoint activation in response to DSB-inducing agents. Our recent result suggests that *kin3Δ* is not proficient in sensing DNA damage and/or conveying this information to the cell cycle control machinery, failing to trigger the DNA damage checkpoint pathways after cisplatin, doxorubicin, HN2 and MMS treatment [4]. To further examine the consequences of the double deletions (i.e., the *KIN3* gene and each member of the MRX complex) on the DNA damage checkpoint, we monitored the

proportion of non-budded (G1 phase), small-budded (an approximation for cells undergoing S phase), and large-budded (G2/M phase) cells 2, 4 and 6 h after cisplatin treatment. Fig. 7 shows the cell-cycle progression of untreated and cisplatin-treated wild-type, single and double-mutant cells. The cell cycles of treated WT cells were delayed and resumed normal cycling after 4 h. This delay was not observed in *kin3Δ*, *mre11Δ*, *rad50Δ* and *xrs2Δ* cells, which continued their cell cycle in both normal and damage-induced situations, suggesting that these mutants are not proficient in sensing cisplatin DNA damage and thereby do not trigger their DNA damage checkpoint pathways (Fig. 7). The double mutant cells, *kin3Δmre11Δ*, *kin3Δrad50Δ* and *kin3Δxrs2Δ*, although displaying a decrease in cell cycle progression during normal growth, also fails to arrest after DNA damage induced by cisplatin as single mutants (Fig. 7).

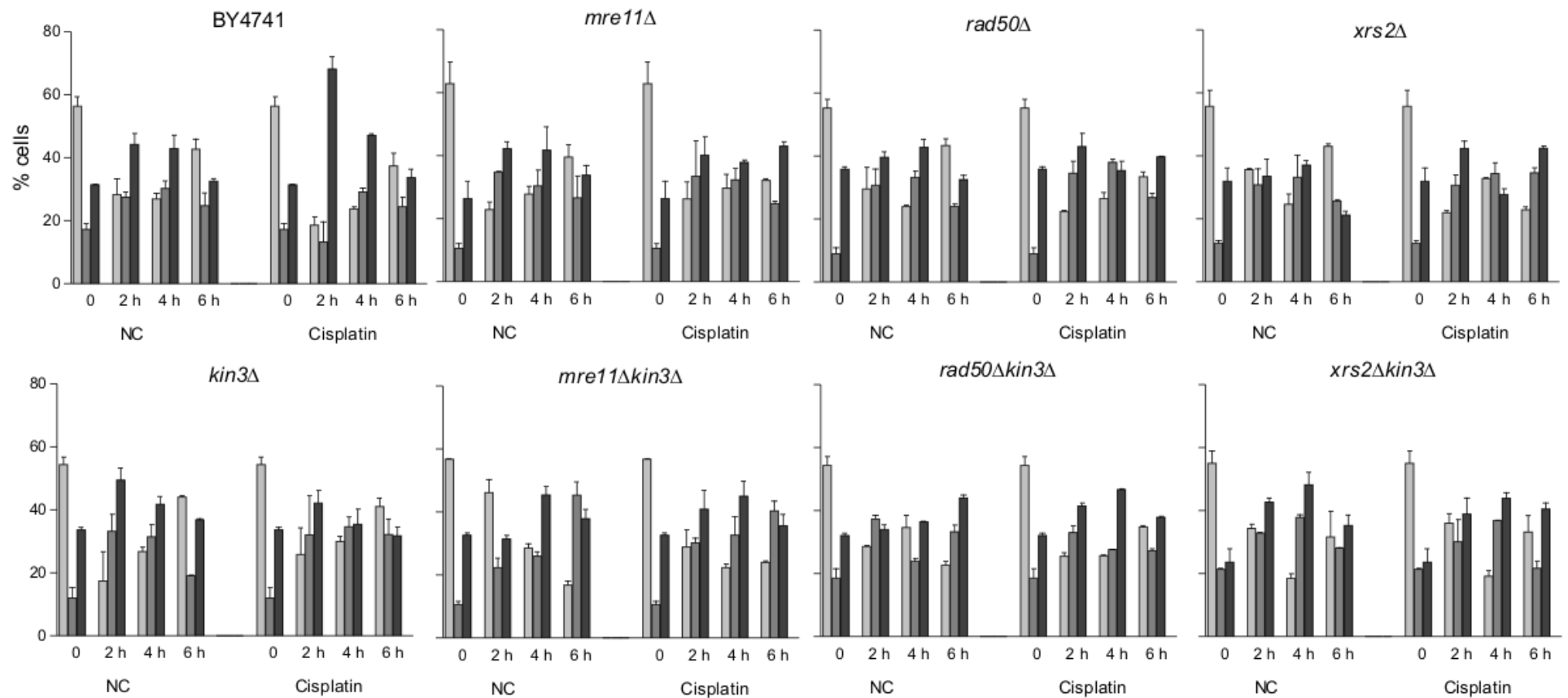


Fig. 7. Distribution of G1 (grey), S (intermediated grey), and G2/M (dark grey) cells in wild-type and single and double mutant strains: left panel, untreated control; right panel, cells with DNA damage (cisplatin).

### 3.5. *KIN3* expression decreases in *mre11Δ*, *rad50Δ* and *xrs2Δ* single mutants

We analyzed the pattern of *KIN3* expression in the wild-type strain previously during mutagenic treatment at several time points (0 – 240 minutes), and we have shown that a significant increase in *KIN3* gene expression occurs after 60 min of treatment with doxorubicin and HN2 [4]. To understand the relationship between the Kin3 protein and the MRX complex protein, we quantified *KIN3* expression in single MRX mutants. As shown in Fig. 8, no significant alteration in *KIN3* gene expression was observed when compared to the wild-type strain after 60 min of treatment with cisplatin, HN2 and 8-MOP plus UVA.

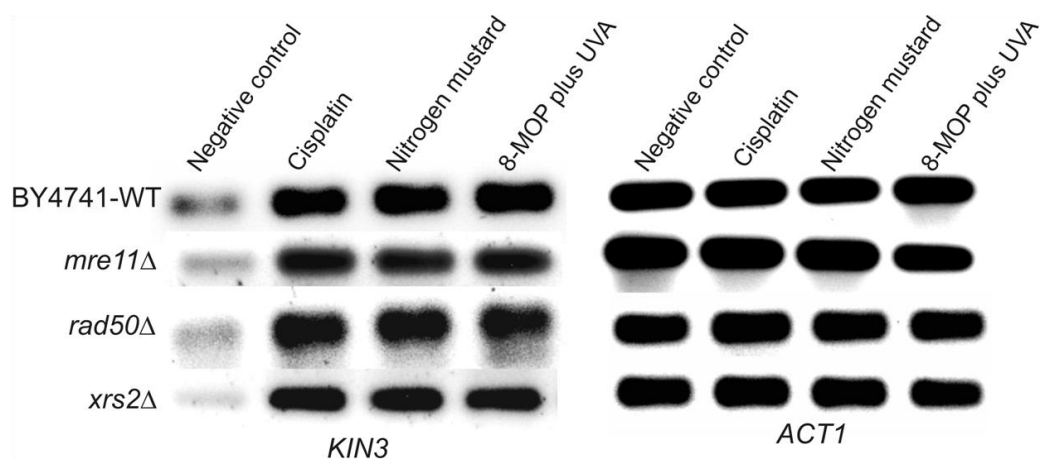


Fig. 8 *KIN3* expression as measured by semi-quantitative RT-PCR. The left row shows the expression of *KIN3* in various evaluated yeast strains, and the right row shows the expression of *ACT1* (constitutive control). The *KIN3* expression measure in the double mutant strains (*kin3Δmre11Δ*, *kin3Δrad50Δ*, *kin3Δxrs2Δ*) was used as negative control (not shown).

## 4. Discussion

Checkpoints play a critical role in maintaining genetic stability by ensuring that DNA repair mechanisms correct DNA damage before replication or segregation of

damaged chromatids [32,33]. The eukaryotic cell cycle is highly conserved, and this conservation has allowed the identification of common regulators in a diverse set of eukaryotes ranging from yeast to humans. As mentioned previously, use of a two-hybrid screen identified the Mre11 protein as a possible molecular partner of Nek1, a NIMA-related kinase, in mammalian cells [18]. Because the phenotype of Kin3-deficient cells [4] is rather similar to those already described for other Nrks and there is a high level of conservation between yeast cellular processes and those of mammalian cells, the search for a functional relationship between Nrk and checkpoint/repair proteins in *S. cerevisiae* appeared very promising. Taking into account all of information, we decided to verify whether the Kin3 protein is a molecular partner of the MRX complex.

At first, we tested whether Mre11 and Kin3 yeast proteins interact using a two-hybrid system. As the Mre11 protein only plays a pivotal role in the activation of damage-induced checkpoints, the repair of DNA double strand breaks (DSB) and telomere maintenance when complexed with Rad50 and the Mre11/Nbs1 proteins [reviewed in 19], we also tested the other two member of the MRX complex – Rad50 and Xrs2. Our interaction trap assay using the full-length *KIN3* gene as bait and each full-length *MRX* gene as prey showed a positive interaction between these proteins (Table 2). Interestingly, the C-terminal deletion (the last 92 aa) did not alter the interaction of Kin3 with MRX proteins (Fig. 1), indicating that this interaction possibly occurs through the Kin3 kinase domain. These interactions were also indicated by co-immunoprecipitation of C-Myc-tagged Kin3 (Fig. 2).

Recently, we provided information showing that Kin3 is a new yeast DNA adduct damage response protein [4]. Here, we have demonstrated that Kin3 shares a common pathway with the MRX complex in response to adduct DNA, as mutants in these proteins

have epistatic interaction (Fig. 3-5). Interstrand cross-linkings (ICLs), despite their low amount, are the most critical cytotoxic adducts produced by cisplatin, HN2 and 8-MOP [34]. Several distinct repair pathways, including nucleotide excision repair (NER), homologous recombination repair (HR) and translesion synthesis (TLS), act in a coordinated manner to resolve DNA adducts [35-37]. Previous reports showed that the *mre11*Δ yeast strain is sensitive to ICL-forming agents and that mammalian Nbs1 is activated in response to ICL, leading to the hypothesis that formation of the Mre11/Rad50/Xrs2(Nbs1) complex at the site of damage is an important contributor to ICL repair [30,36,38]. Our results reinforce the role of the MRX complex in this response and add the protein Kin3 as a new player in this process, regardless of whether the ICLs occur between purines (cisplatin and HN2) or pyrimidines (8-MOP) [39-41]. This physical interaction was also observed under genotoxic conditions (Fig. 1).

Mammalian Nek1-deficient cells are defective in G<sub>2</sub>/M-phase checkpoints in response to DNA damage and fail to activate the downstream crucial mediators Chk1 and Chk2. Chen et al. [11] suggested that the most proximal or upstream sensor in the DNA damage response is the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. Because γ-H2AX is activated and localized to DNA damage sites soon after DNA damage in Nek1-deficient cells, it has been suggested that Nek1 is not required for direct ATR and ATM (Mec1 and Tel1 in yeast, respectively) activation and can be involved in the activation of intermediaries in these pathways [11,15,16]. Kin3 acts at the G<sub>2</sub>-phase in response to DNA adduct damage [4], and similarly, the MRX mutants (*mre11*Δ, *rad50*Δ and *xrs2*Δ) fail to arrest at the G<sub>2</sub>/M-phase checkpoint during cisplatin treatment, as do the *kin3*Δ*mre11*Δ, *kin3*Δ*rad50*Δ and *kin3*Δ*xrs2*Δ double mutants (Fig. 7).

Although the response of cells to ICL DNA damaging agents is somewhat established, little is known about cell cycle arrest after treatment with ICL inducers, which lead to G<sub>2</sub>-phase delay, in general [28,37,39,42]. In mammalian cells, the ICL response is better characterized and occurs in ATR- and ATM-mediated checkpoint pathways [42-46]. In yeast, the ICL response appears to be mediated by Mec1 [28]. The MRX complex can function together with both Mec1 (ATR) and Tel1 (ATM) to trigger checkpoint activation leading to activation of the checkpoint kinases Rad53 (Chk2) and Chk1 [47,48]. These results of the MRX interaction are in accordance with previous suggestions that Kin3 might be a player in the Mec1/Tel1-mediated signaling pathway [4].

The absence of changes in *KIN3* gene expression in MRX simple mutants relative to the wild type strain (Fig. 8) might indicate that MRX complex formation is not necessary to drive *KIN3* synthesis, and that the interaction probably occurs after the translation step. Another possible finding of this result is that the Kin3 protein could be acting at a step prior to MRX complex formation. However, it is premature to assume the exact steps that lead to activation of these proteins.

In this work, we were able to show that the Kin3 protein interacts genetically and physically with each protein of the MRX complex. In this scenario, *KIN3* synthesis does not require MRX complex formation. Moreover, our results provide more evidence that the MRX complex is involved in the yeast ICL response, as in mammalian cells. Due to the highly conserved nature of the cell-cycle machinery between yeast and humans, yeast studies provide a valuable system to study cell-cycle regulation, which is defective in cancer cells [49]. Mutations in Nbs1 and Mre11 are related to two syndromes, Nijmegen break syndrome (NBS) and Ataxia telangiectasia-like disorder (ATLD), respectively, which generate checkpoint defects and chromosome instability [50]. Characterization of

the MRX complex and its molecular partners, such as the Nrk proteins, can provide valuable insight about tumorigenesis, not only in the syndromes mentioned but also in understanding cancer predisposition in general. In this sense, Nima-related kinases may be novel targets for cancer treatment. Further investigation of the detailed mechanism by which Kin3 interacts with MRX will provide important insights to elucidate this possibility.

### Acknowledgments

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Grant No. 477391/2007-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). D.J.M. held a CNPq fellowship in a PhD degree program. J.A.P.H., G.L. and J.S. are recipients of CNPq fellowships.

### References

- [1] D.G. Jones, J. Rosamond, Isolation of a novel protein kinase-encoding gene from yeast by oligodeoxyribonucleotide probing, *Gene* 90 (1990) 87-92.
- [2] B. Schweitzer, P. Philippsen, NPK1, a nonessential protein kinase gene in *Saccharomyces cerevisiae* with similarity to *Aspergillus nidulans* nimA, *Mol. Gen. Genet.* 234 (1992) 164-167.
- [3] A.B. Barton, C.J. Davies, C.A. Hutchison, D.A. Kaback, Cloning of chromosome I DNA from *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the *FUN52* gene, whose product has homology to protein kinases, *Gene* 117 (1992) 137-140.
- [4] D.J. Moura, J.C. Rocha, B.F. Immich, B. Castilhos, A.C.R. Silva, J.M. Cardone, J.A.P. Henriques, G. Lenz, J. Saffi, Kin3 protein, a NIMA-related kinase of *Saccharomyces*



*cerevisiae*, is involved in DNA adduct damage response, Cell Cycle (2010) accepted manuscript.

[5] S.A. Osmani, R.T. Pu, N.R. Morris, Mitotic induction and maintenance by over expression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase, Cell 52 (1988) 237-244.

[6] A.H. Osmani, S.L. McGuire, S.A. Osmani, Parallel activation of the NIMA and p34cdc2 cell cycle regulated protein kinases is required to initiate mitosis in *A. nidulans*, Cell 67 (1991) 283-291.

[7] A.H. Osmani, K. O'Donnell, R.T. Pu, S.A. Osmani, Activation of the nimA protein kinase plays a unique role during mitosis that cannot be bypassed by absence of the bimE checkpoint, EMBO J. 10 (1991) 2669-2679.

[8] M.J. O'Connell, M.J. Krien, T. Hunter, Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control, Trends Cell Biol. 13 (2003) 221-228.

[9] L. O'regan, J. Blot, A.M. Fry, Mitotic regulation by NIMA-related kinases, Cell Div. 2 (2007) 25.

[10] D.G. Hayward, R.B. Clarke, A.J. Faragher, M.R. Pillai, I.M. Hagan, A.M. Fry, The Centrosomal Kinase Nek2 Displays Elevated Levels of Protein Expression in Human Breast Cancer, Cancer Res. 64 (2004) 7370-60.

[11] Y. Chen, P.L. Chen, C.F. Chen, X. Jiang, D.J. Riley, Never-in-mitosis related kinase 1 functions in DNA damage response and checkpoint control, Cell Cycle 7 (2008) 3194-3201.

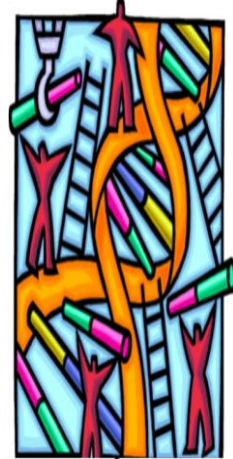
[12] M.Y. Lee, H.J. Kim, M.A. Kim, H.J. Jee, A.J. Kim, Y.S. Bae, J.I. Park, J.H. Chung, J.Yun, Nek6 is involved in G2/M phase cell cycle arrest through DNA damage-induced phosphorylation, Cell Cycle 7 (2008) 2705-2709.

- [13] M. Melixetian, D.K. Klein, C.S. Sorensen, K. Helin, NEK11 regulates CDC25A degradation and the IR-induced G2/M checkpoint, *Nat. Cell Biol.* 11 (2009) 1247-1253.
- [14] C.S. Sorensen, M. Melixetian, D.K. Klein, K. Helin, NEK11: linking CHK1 and CDC25A in DNA damage checkpoint signaling, *Cell Cycle* 9 (2010) 450-455.
- [15] A.L. Pelegrini, D.J. Moura, B.L. Brenner, P.L. Ledur, G.P. Marques, J.A.P. Henriques, J. Saffi, G. Lenz, Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage induced cell cycle arrest, *Mutagenesis* (2010) accepted manuscript.
- [16] Y. Chen, D.J. Riley, L. Zheng, P.L. Chen, W.H. Lee, Phosphorylation of the mitotic regulator protein Hec1 by Nek2 kinase is essential for faithful chromosome segregation, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 49408-49416.
- [17] R. Polci, A. Peng, P.L. Chen, D.J. Riley, Y. Chen, NIMA-related protein kinase 1 is involved in the ionizing radiation-induced DNA damage response, *Cancer Res.* 64 (2004) 8800-8803.
- [18] M.J. Surpili, T.M. Delben, J. Kobarg, Identification of proteins that interact with the central coiled-coil region of the human protein kinase NEK1, *Biochemistry* 42 (2003) 15369-15376.
- [19] D. D'Amours, S.P. Jackson, The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signaling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002) 317-327.
- [20] T. Usui, T. Ohta, H. Oshiumi, J. Tomizawa, H. Ogawa, T. Ogawa, Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination, *Cell* 95 (1998) 705-716.
- [21] M. Grenon, C.P. Magill, N.F. Lowndes, S.P. Jackson, Double-strand breaks triggers MRX-and Mec1-dependent, but Tel1-independent, checkpoint activation, *FEMS Yeast Res.* 6 (2006) 836-847.

- [22] N.F. Lowndes, J.R. Murguia, Sensing and responding to DNA damage, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10 (2000) 17-25.
- [23] K.A. Nyberg, R.J. Michelson, C.W. Putnam, T.A. Weinert, Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints, *Annu. Rev. Genet.* 36 (2002) 617-656.
- [24] J. Rouse, S.P. Jackson, Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage, *Science* 297 (2002) 547-51.
- [25] D. Burke, D. Dawson, T. Stearns, *Methods in Yeast Genetics a Cold Spring Harbour Laboratory Course Manual*. New York, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2000.
- [26] R.D. Gietz, R.A. Woods, Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method, *Methods Enzymol.* 350 (2002) 87-96.
- [27] J. Sambrook, E.R. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- [28] J.M. Cardone, L.F. Revers, R.M. Machado, D. Bonatto, M. Brendel, J.A. Henriques, Psoralen-sensitive mutant *pso9-1* of *Saccharomyces cerevisiae* contains a mutant allele of the DNA damage checkpoint gene *MEC3*, *DNA Repair* 5 (2006) 163-171.
- [29] P.J. McHugh, R.D. Gill, R. Waters, J.A. Hartley, Excision repair of nitrogen mustard-DNA adducts in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) 3259-3266.
- [30] 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.
- [31] T.P. Heffernan, D.A. Simpson, A.R. Frank, A.N. Heinloth, R.S. Paules, M. Cordeiro-Stone, W.K. Kaufmann, An ATR- and Chk1-dependent S checkpoint inhibits replicon initiation following UVC-induced DNA damage, *Mol. Cell Biol.* 22 (2002) 8552-61.

- [32] P.A. Jeggo, M. Löbrich, Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability, *DNA Repair* 5 (2006) 1192-8.
- [33] M. Lisby, J.H. Barlow, R.C. Burgess, R. Rothstein, Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins, *Cell* 118 (2002) 699-713.
- [34] D.M. Noll, T.M. Mason, P.S. Miller, Formation and repair of interstrand cross-links in DNA, *Chem. Rev.* 106 (2006) 277-301.
- [35] M.L. Dronkert, R. Kanaar, Repair of interstrand cross-links, *Mutat. Res.* 486 (2001) 217-247.
- [36] K.F. Grossmann, J.C. Brown, R.E. Moses, Cisplatin DNA cross-links do not inhibit S-phase and cause only a G2/M arrest in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutat. Res.* 434 (1999) 29-39.
- [37] P. Lehoczký, P.J. McHugh, M. Chovanec, DNA interstrand cross-link repair in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol. Rev.* 31 (2007) 109-33.
- [38] P. Pichierri, F. Rosselli, The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways, *EMBO J.* 23 (2004) 1178-1187.
- [39] V. Meniel, N. Magana-Schwencke, D. Averbeck, R. Waters, Preferential incision of interstrand cross-links induced by 8-methoxypsoralen plus UVA in yeast during the cell cycle, *Mutat. Res.* 384 (1997) 23-32.
- [40] M. Brendel, J.A. 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.
- [41] M. Ben-Yehoyada, L.C. Wang, I.D. Kozekov, C.J. Rizzo, M.E. Gottesman, J. Gautier, *Mol. Cell.* 35 (2009) 704-15.

- [42] M. Frankenberg-Schwager, D. Kirchermeier, G. Greif, K. Baer, M. Becker, D. Frankenberg, Cisplatin-mediated DNA double-strand breaks in replicating but not in quiescent cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Toxicology* 212 (2005) 175-84.
- [43] K. Nakanishi, T. Taniguchi, V. Ranganathan, H.V. New, L.A. Moreau, M. Stotsky, Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response, *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) 913–920.
- [44] P. Pichierri, D. Averbeck, F. Rosselli, DNA cross-link-dependent RAD50/MRE11/NBS1 subnuclear assembly requires the Fanconi anemia C protein, *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002) 2531–2546.
- [45] P. Pichierri, F. Rosselli, The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR- NBS1-FANCD2 pathways, *Embo J.* 23 (2004) 1178–1187.
- [46] J.B. Bae, S.S. Mukhopadhyay, L. Liu, N. Zhang, J. Tan, S. Akhter, X. Liu, X. Shen, L. Li, R.J. Legerski, Snm1B/Apollo mediates replication fork collapse and S Phase checkpoint activation in response to DNA interstrand cross-links, *Oncogene* 27 (2008) 5045-5056.
- [47] M.F. Schwartz, J.K. Duong, Z. Sun, J.S. Morrow, D. Pradhan, D.F. Stern, Rad9 phosphorylation sites couple Rad53 to the *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint, *Mol. Cell* 9 (2002) 1055-1065.
- [48] R.T. Blankley, D. Lydall, A domain of Rad9 specifically required for activation of Chk1 in budding yeast, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 601-608
- [49] J.A. Simon, A. Bedalov, Yeast as a model system for anticancer drug discovery, *Nat. Rev. Cancer* 4 (2004) 481-492.
- [50] V. Borde, J. Cobb. Double functions for the Mre11 complex during DNA double-strand break repair and replication, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 1249-1253.



**DISCUSSÃO  
GERAL**



## V. DISCUSSÃO GERAL

O DNA é o portador da informação genética na maioria dos organismos. Qualquer dano a sua estrutura molecular tem potencial para causar instabilidade genômica, mutagênese, morte celular ou mesmo a transformação celular. Infelizmente, o dano no DNA é inevitável, já que está continuamente exposto a insultos exógenos e endógenos, bem como as falhas da sua própria replicação. Durante a divisão celular eucariótica, o objetivo primordial é superar estes numerosos insultos, duplicando fielmente as informações genéticas uma vez a cada ciclo. Sendo assim, não é de estranhar que os organismos vivos desenvolveram inúmeras vias para lidar com lesões na molécula de DNA (FRIEDBERG *et al.*, 2006). Os danos ao DNA podem perturbar o equilíbrio celular e ativar ou amplificar determinadas vias bioquímicas que regulam o crescimento e divisão celular (pontos de checagem), assim como as vias que ajudam a coordenar a replicação do DNA com a remoção de danos (vias de reparação de DNA) (MERRY *et al.*, 2010).

Na última década, o progresso no entendimento dos mecanismos de detecção, sinalização e reparação de danos no DNA tem sido enorme (ASHWELL & ZABLUDOFF, 2008). Entretanto, muitos detalhes moleculares ainda esperam por respostas, especialmente no que tange as etapas de reconhecimento das lesões que dão início as vias de checagem de ciclo celular, assim como a coordenação entre os processos de reparação de DNA e as vias de checagem de ciclo celular na resposta a danos específicos no DNA. A busca de novas proteínas envolvidas nestes processos pode ser importante para o entendimento destas lacunas.

O gene *KIN3* foi descoberto no início da década de 1990 como não essencial para as células de levedura, já que sua deleção não afeta crescimento, acasalamento e esporulação (JONES & ROSAMOND, 1990; SCHWEITZER & PHILIPPSEN, 1992;

BARTON *et al.*, 1992), com a sugestão de que a proteína que codifica este gene, previamente identificada como ortóloga a proteína de ciclo celular NIMA de *A. nidulans* (SCHWEITZER & PHILIPPSEN, 1992), poderia estar associada a uma função condicional em *S. cerevisiae*. Neste sentido, os resultados apresentados nesta tese apontam para o envolvimento desta proteína na resposta a estresse genotóxico, já que a deleção do gene *KIN3* induz uma sensibilidade pronunciada a diferentes agentes genotóxicos, entre estes, cisplatina, doxorubicina, HN2 e MMS. Além disso, estas células apresentam falha na parada de ciclo celular no ponto de checagem G<sub>2</sub>/M (Capítulo I). Em geral, células sem pontos de checagem funcionais apresentam instabilidade genômica, devido a falhas em responder apropriadamente aos danos no DNA que podem resultar em morte (FASULLO & SUN, 2008).

A cisplatina, a doxorubicina, a HN2 e o MMS são agentes que podem formar adutos com o DNA, como já detalhado na Introdução (seção 1.4). Enquanto o MMS forma monoadutos, os demais agentes podem induzir a formação de ICLs. O sistema de reparação destas lesões é complexo, mas conhecido. Entretanto, a sinalização que leva à parada de ciclo celular para reparação não é totalmente compreendida. Normalmente, esta parada do ciclo celular está relacionada com o bloqueio da forquilha de replicação na fase S. Ela também pode acontecer na fase G<sub>2</sub>/M, como consequência da formação de quebras no DNA relacionadas ao bloqueio da forquilha de replicação ou aos processos de reparação destas lesões (STASZEWSKI *et al.*, 2008; MUNIANDY *et al.*, 2010). A formação de quebras após tratamento com indutores de adutos, associada à parada de ciclo celular em G<sub>2</sub> observada na linhagem mutante *kin3Δ*, indica que esta proteína não esteja envolvida nas etapas iniciais de reconhecimento destas lesões (Capítulo I). Adicionalmente, a reparação destas quebras na molécula de DNA parece não acontecer nas células *kin3Δ*, sugerindo o



envolvimento da proteína Kin3 na sinalização destas quebras. Entretanto, a ausência de sensibilidade da linhagem mutante aos agentes UVC e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), indica que a proteína Kin3 possa ter uma especificidade para intermediários de lesões do tipo ICL e alquilação de bases, e não especificamente a quebras no DNA, já que, UVC e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também podem induzir formação de quebras no DNA como consequência da lesão primária (ZHAO *et al.*, 2008; KAUFMANN, 2010).

De modo geral, a sinalização celular que resulta em parada de ciclo celular após alquilação de bases ou formação de ICLs é mediada pelas proteínas sinalizadoras ATR (Mec1) em fase S ou ATM (Tel1), com ou sem participação de ATR (Mec1), na fase G<sub>2</sub> (BROZOVIC *et al.*, 2009; CARROZZA *et al.*, 2009; SZYJKA *et al.*, 2008). Em mamíferos, em resposta a alquilação de bases na fase S, acontece a ativação de Chk1 mediada por ATR, na fase G<sub>2</sub>/M, ocorre a ativação de Chk2 mediada por ATR (PASCUCCI *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2006; HORTON *et al.* 2007; STASZEWSKI *et al.*, 2008; CARROZZA *et al.*, 2009). Em *S. cerevisiae*, a proteína Mec1 (homóloga de ATR) também está envolvida na resposta a danos induzidos por MMS ativando, além de Chk1, como em mamíferos, a proteína Rad53 (SZYJKA *et al.*, 2008). Nossos dados indicam que em leveduras também pode ocorrer parada em G<sub>2</sub>/M na resposta a MMS (Capítulo I).

A indução de parada de ciclo celular em resposta a ICLs em geral acontece nas fases S e G<sub>2</sub>/M (revisado por BROZOVIC *et al.*, 2009). Em mamíferos, três principais vias de sinalização têm sido sugeridas, ambas mediadas por ATR, a primeira com ativação de Chk1 (PICHIERRI & ROSSELLI, 2004; BROZOVIC *et al.*, 2009), a segunda envolvendo Nbs2 e FancD2 (NAKANISH *et al.*, 2005) e, embora Chk2 não seja o substrato preferencial de ATR, parece interagir com a mesma induzindo parada de ciclo, representando a terceira via de sinalização (PABLA *et al.* 2008). Em leveduras, a via de

ativação de parada de ciclo celular também parece ser mediada pelo homólogo de ATR, a proteína Mec1, mediada pelos complexos Ddc1/Mec3/Rad17 e Rad24/Rfc2-5, com ativação de Rad9 e de ambas cinases efetoras Chk1 e Rad53 (CARDONE *et al.* 2006). Além disso, tem sido sugerida uma ativação tardia de checkpoint em G<sub>2</sub>/M mediada por ATM, provavelmente em função da formação de quebras duplas no DNA, com participação do complexo MRX (BAE *et al.*, 2010). O aumento da sensibilidade da linhagem *kin3Δ* e o bloqueio da expressão do gene *KIN3* na linhagem selvagem, durante co-tratamento com cisplatina, doxorubicina, HN2 ou MMS e cafeína, inibidor das cinases ATM e ATR, indica a participação da proteína Kin3 na resposta a estas lesões em uma via dependente de Tel1/Mec1 (Capítulo I). Os ortólogos de NIMA em mamíferos Nek1 e Nek11 atuam na via ATM/ATR de formas diferentes. Enquanto Nek1 não interage diretamente com estas proteínas, Nek11 é fosforilada por ATR (CHEN *et al.*, 2008; MELIXETIAN *et al.*, 2009).

Entre os homólogos de NIMA em mamíferos, a proteína Nek1 é melhor caracterizada no que se refere a resposta a lesões no DNA (POLCI *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2008; PELEGRINI *et al.*, 2010). A proteína Mre11 tem sido sugerida como possível parceira molecular de Nek1 (Introdução, Seção 1.7.1). Nossos resultados demonstram que, em levedura, há interação da proteína Kin3 com as proteínas do complexo MRX (Capítulo II). Embora linhagens de *S. cerevisiae* mutantes para os genes codificadores das proteínas do complexo MRX apresentem pronunciada sensibilidade a agentes indutores de danos no DNA (MCHUGH *et al.*, 2000; LAM *et al.*, 2008; Capítulo II), os dados sobre a participação do complexo MRX nestas respostas ainda são insipientes. A proteína Mre11, por exemplo, parece estar envolvida no processamento de estruturas intermediárias no processo de reparação de ICL, com função redundante com as proteínas Exo1 e Pso2,

assim como na resposta a lesões induzidas por MMS (LAM *et al.*, 2008). Neste sentido, nossos dados reforçam a participação deste complexo na resposta a ICLs e adicionam uma nova proteína nessa via, Kin3. Em leveduras, a sinalização mediada pelo complexo MRX acontece via Tel1, de maneira dependente ou independente de Mec1 (MANTIERO *et al.*, 2007), de forma que os dados de interação com o complexo MRX reforçam nossa hipótese inicial de que a proteína Kin3 atuaria em uma via dependente de Mec1/Tel1, já que este complexo parece estar envolvido no processamento destas lesões e sinalização para ativação de parada de ciclo celular (BAE *et al.*, 2008).

Considerando as informações apresentadas nesta Tese, na sinalização para parada de ciclo celular na fase G<sub>2</sub>/M, em resposta a formação de adutos no DNA, estruturas intermediárias, geradas pelos sistemas de reparação como o NER, por exemplo, seriam sinalizadas pelo complexo MRX. A interação de Mre11p com Tel1p induziria a auto-ativação de Tel1p, que atuaria então fosforilando as proteínas Mre11 e Xrs2, como demonstrado por LISBY *et al.* (2004). A proteína Mre11 faria, de forma aditiva ou redundante com as proteínas Pso2 e Exo1, o processamento das estruturas intermediárias geradas pela retirada das ICLs, resultando em estruturas que aumentam a sinalização para parada de ciclo celular. A proteína RPA também parece ser importante nesta sinalização (MELO *et al.*, 2001). Este sinal pode ser amplificado ainda pela ativação da proteína Mec1 (via Tel1), associada a Ddc2p e aos complexos Ddc1p/Mec3p/Rad17p e Rad24p/Rfc2-5p (CARDONE *et al.*, 2006). Mec1p e Tel1p ativariam Rad9p, e esta, diferente do que acontece em células de mamífero, ativaria ambas cinases efetoras Chk1 e Rad53 de maneira redundante (Figura 12A). Nesta via de sinalização, a proteína Kin3 poderia atuar recrutando o complexo MRX para o local da lesão através do reconhecimento das estruturas intermediárias das ICLs geradas pelo sistema de reparação de DNA. O aumento

da expressão do gene *KIN3* nos mutantes MRX (Capítulo II) sugere que a indução do mesmo na resposta a danos no DNA independe da presença do complexo MRX, possivelmente com a proteína Kin3 atuando em uma etapa anterior a formação do complexo MRX, conforme mostrado na Figura 12B. Entretanto, como modificações pós-traducionais provavelmente ocorram para tornar Kin3 ativa, é prematuro assumir se de fato isso acontece. Experimentos de fosforilação *in vitro* poderão ser úteis para determinar se as proteínas do complexo MRX são substratos para Kin3p. Além disso, estudos de co-localização com estas proteínas, poderão auxiliar na identificação temporal da formação de *foci* no local da lesão nesta via de sinalização.

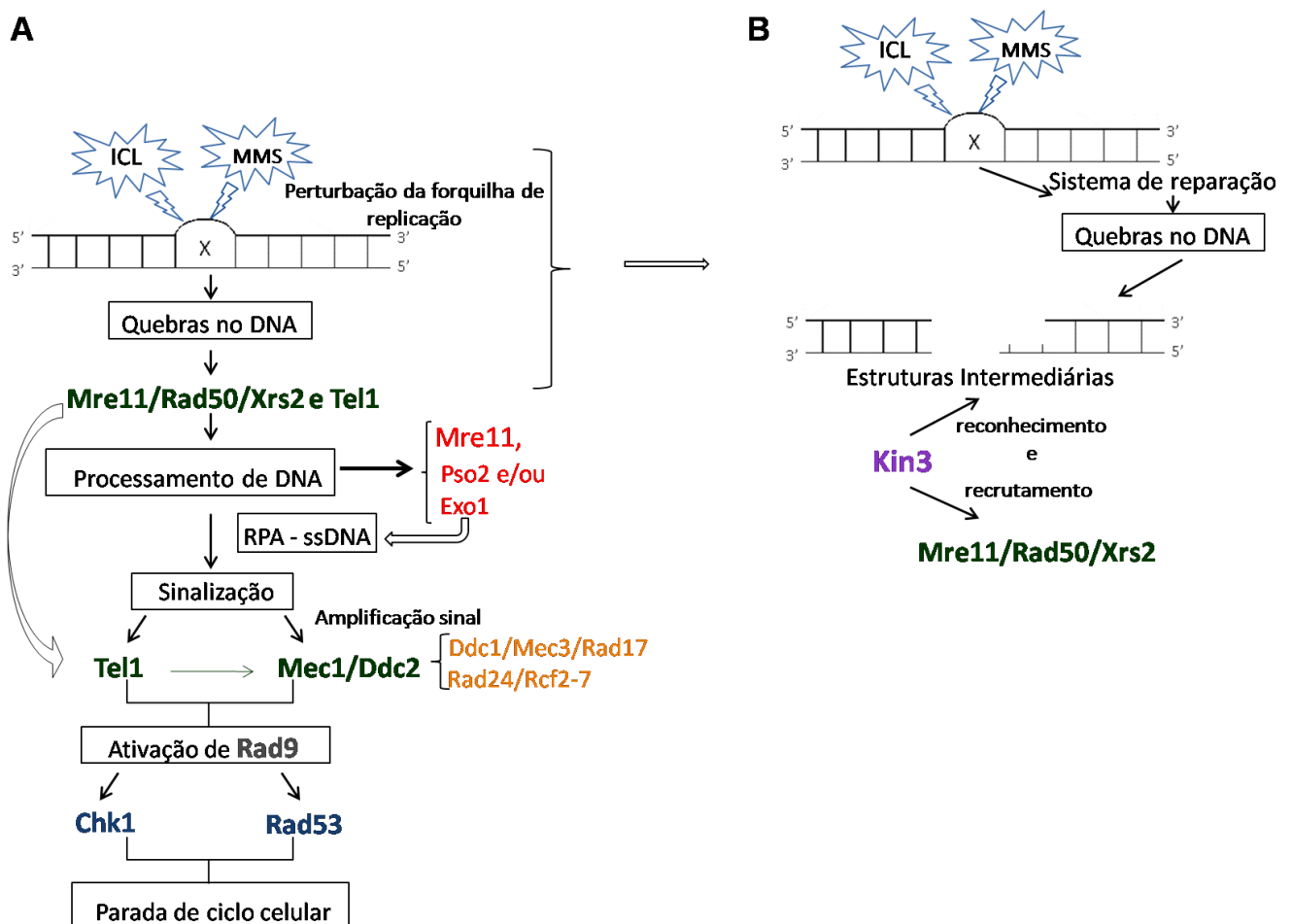


Figura 12. Modelo de ativação de parada de ciclo celular após formação de adutos no DNA na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular. A) A formação de ICL resulta em perturbações na forquilha

de replicação, que podem ter como consequência a formação de quebras no DNA, que são reconhecidas pelo complexo MRX, que além de recrutar a proteína Tel1 ao local da lesão faz o processamento destas quebras. Tel1 pode amplificar esta sinalização ativando a cinase Mec1 e os complexos ligados a ela (detalhes no texto), levando a ativação de Rad9p e por fim as cinases efetoras Chk1p e Rad53p, com a consequente parada de ciclo celular.

B) Participação da proteína Kin3, no reconhecimento de lesões intermediárias de DNA (provavelmente formadas após processamento inicial de ICLs pelo sistema de reparação) e recrutamento do complexo MRX ao local da lesão.

As relações de Kin3p com proteínas do sistema de reparação de DNA que geram estas estruturas intermediárias podem trazer mais informações que conduzam ao entendimento desta via de sinalização. Os resultados preliminares indicam que o mutante *kin3Δ* interage epistaticamente com o mutante *rad1Δ* na resposta a cisplatina (Anexo 1). O complexo formado pelas proteínas Rad1 e Rad10 (homólogos de XPF e ERCC1 de mamíferos) faz parte do NER e é responsável pela incisão no sentido 5' na fita de DNA contendo a ICL (BHAGWAT *et al.*, 2009). A interação de *kin3Δ* com o mutante *rad52Δ* na resposta a cisplatina também parece ser epistática, já a deleção do gene *KIN3* induz um aumento de sensibilidade no mutante *ku70Δ* tratado com cisplatina, indicado que estas proteínas atuam em vias diferentes (Anexo 1). As proteínas Rad52 e Ku70 participam da resposta a quebras duplas no DNA nas vias HR e NHEJ, respectivamente (revisado por SHRIVASTAV *et al.*, 2008). A deleção do gene *KIN3* no mutante *rev7Δ*, deficiente na subunidade acessória da polimerase  $\zeta$ , não alterou a sensibilidade durante o tratamento com cisplatina (Anexo 1). Embora esteja claro que a via NER e HR, representadas aqui pelas proteínas Rad1 e Rad52, respectivamente, atuam na reparação de ICLs, a forma como isto acontece ainda não está bem definida, assim como a interação das proteínas do NER com o complexo MRX nesta resposta. Além disso, como comentado por

LEHOCZKY *et al.* (2007), a interpretação das aparentes interações genéticas, epistáticas e não-epistáticas, envolvendo diferentes mecanismos de reparação de ICL é muito complexa, refletindo os múltiplos caminhos que podem competir por intermediários durante as várias fases de reparação de ICL, e que estes podem ser sobrepostos, parcialmente sobrepostos ou totalmente distintos. Neste sentido, mais informações sobre a interação de Kin3 com proteínas do NER ou HR devem ser obtidas para confirmação destes dados.

A deleção de 92 aminoácidos da porção terminal de Kin3 não afetou a interação com as proteínas do complexo MRX (Capítulo III). Dessa forma, provavelmente, diferente de outras proteínas que contêm domínios regulatórios para interação com parceiros moleculares (O'CONNELL, *et al.*, 2003), a proteína Kin3 interage com outras proteínas através do próprio domínio cinásico, o que pode sugerir uma interação momentânea, somente para ativação de um substrato por fosforilação, por exemplo. Como mencionado na introdução, a proteína apresenta regiões regulatórias extremamente conservadas em seu domínio cinásico. Na proteína NIMA, por exemplo, a mudança de um ácido glutâmico da posição 41 para uma glicina leva a um fenótipo sensível a temperaturas altas, induzindo parada em G<sub>2</sub> (OSMANI *et al.*, 1988; 1988). Resíduos ácidos conservados foram descritos em ortólogos de NIMA, inclusive na proteína Kin3, que apresenta um resíduo de ácido aspártico na posição 55 (JONES & ROSAMOND, 1990; BARTON *et al.*, 1992). A substituição do resíduo de ácido glutâmico na proteína humana Nek2 por uma glicina impede a fosforilação da proteína Hec1 (que é substrato de Nek2), e o mesmo parece ocorrer com a substituição desse resíduo em Kin3, sugerindo que o mesmo é importante para ativação de parceiros moleculares (CHEN *et al.*, 2002). A substituição deste resíduo na proteína Kin3 pode ser importante para avaliação da interação *in vivo* com o complexo MRX.

Por outro lado, os resultados de co-imunoprecipitação, podem sugerir uma interação mais permanente de Kin3 com as proteínas do complexo MRX (Capítulo II). Dessa forma, a proteína Kin3, após ativação das proteínas Mre11 e Xrs2 pela proteína Tel1, manteria o complexo MRX unido durante a cascata de sinalização para ativação das proteínas efetoras Chk1 e Rad53, ou ainda, durante as etapas de processamento das extremidades das DSBs pelo complexo, por exemplo (Figure 13). Como o complexo MRX participa efetivamente dos processos de reparação de quebras duplas em ambas as vias, homóloga e não homóloga, uma possível função de Kin3 durante estes processos não pode ser descartada, especialmente na via de recombinação homóloga que ocorre durante a reparação de intermediários de lesões do tipo ICL (LIU *et al.*, 2008; VASQUEZ, 2010).

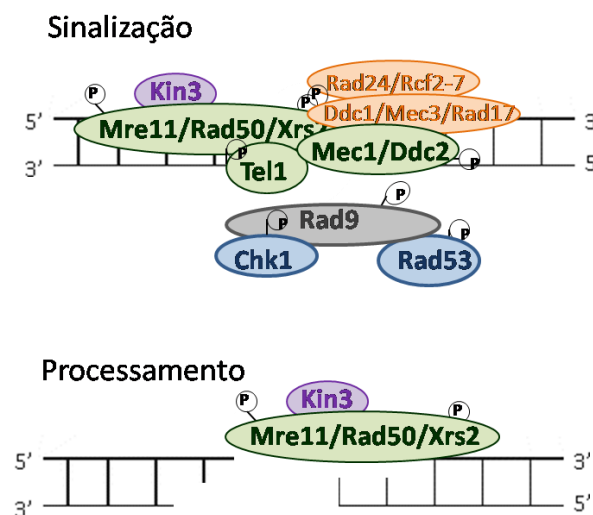
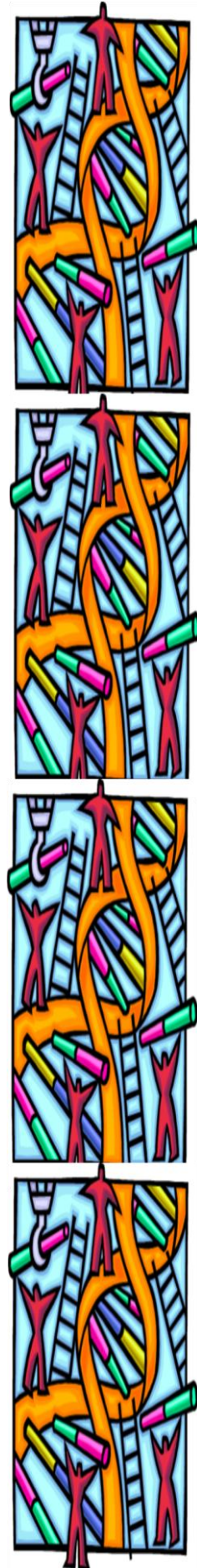


Figura 13. Modelo de interação de Kin3 com o complexo MRX durante os processos de sinalização celular e/ou processamento das extremidades geradas durante o processo de reparação das ICLs.

O entendimento da interação entre as proteínas do complexo MRX com a proteína Kin3 na resposta a lesões do tipo ICL, assim como a compreensão exata da função do

complexo MRX nestas respostas pode ser importante se considerarmos que alguns tumores, por exemplo, desenvolvem resistência a cisplatina (ou outros agentes bifuncionais) principalmente porque se tornam capazes de reparar ICLs. O silenciamento da proteína Rad50 foi recentemente utilizado como uma estratégia para melhorar as repostas à cisplatina em carcinoma de células escamosas (ABUZEID *et al.* 2009). Além disso, mutações nas proteínas Nbs1 e Mre11 estão relacionadas a duas síndromes chamadas Síndrome de quebra de Nijmegen (*Nijmegen break syndrome* - NBS) e desordem semelhante à Ataxia telangiectasia (*ataxia telangiectasia-like disorder* - ATLD), respectivamente. Estas duas síndromes geram instabilidade cromossômica (resultante de uma resposta defeituosa a quebras duplas no DNA) e maior suscetibilidade ao câncer, entre outras. A caracterização do complexo MRX e de parceiros moleculares, como as proteínas relacionadas à NIMA, são de extrema importância para o entendimento destas síndromes.





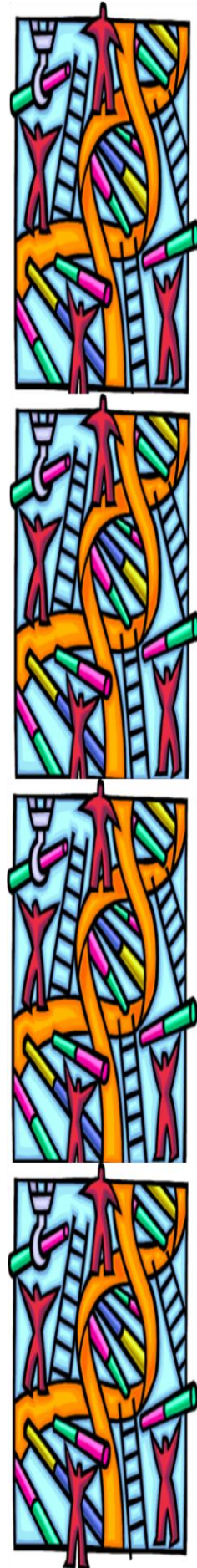
## CONCLUSÕES

## Conclusões

Os processos de resposta a danos no DNA são complexos e desempenhados por vias multi-protéicas que interagem entre si, de forma coordenada e regulada, visando à manutenção da estabilidade genômica. A busca pelo entendimento destas vias de sinalização, reparação, tolerância a danos no DNA e morte celular é constante. Neste sentido, nesta tese é apresentada uma nova proteína envolvida na sinalização de danos no DNA, chamada proteína Kin3. Este estudo trouxe as seguintes conclusões:

- A deleção do gene *KIN3* induz sensibilidade aos agentes indutores de adutos no DNA, cisplatina, doxorubicina, HN2 e MMS;
- A ausência de Kin3 não induz sensibilidade aumentada após tratamento com UVC e peróxido de hidrogênio;
- As células *kin3Δ* não são capazes de detectar lesões no DNA e prosseguem no ciclo celular após tratamento com cisplatina, doxorubicina, HN2 e MMS;
- Ocorre formação de quebras no DNA em linhagens *kin3Δ* após tratamento com cisplatina, doxorubicina, HN2 e MMS, indicando que a ausência de Kin3 não interfere no processamento inicial das lesões induzidas por estes agentes;
- Há um aumento de expressão da proteína Kin3 após tratamento genotóxico, condizente com o período de parada de ciclo celular;
- Kin3 parece interagir em uma via dependente de Tel1/Mec1.

- A proteína Kin3 interage fisicamente com cada uma das proteínas do complexo Mre11/Rad50/Xrs2, mesmo na ausência de tratamento genotóxico;
- A deleção da porção C-terminal da proteína Kin3 (retirada dos 92 aminoácidos finais) não interfere na interação com as proteínas do complexo MRX;
- *KIN3* interage geneticamente com cada um dos genes do complexo *MRX* de forma epistática, após tratamento com agentes indutores de ICL.
- A formação do complexo MRX não parece ser necessária para a indução da expressão do gene *KIN3*, após estresse genotóxico induzido por cisplatina, doxorubicina e HN2.



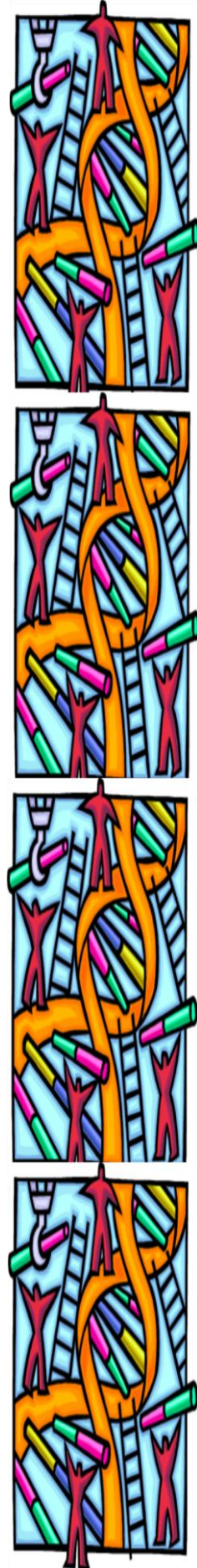
## PERSPECTIVAS

## Perspectivas

A proteína Kin3 está envolvida na resposta a formação de adutos (mono- e bifuncionais) no DNA. Embora o conjunto de dados apresentados nesta tese suporte esta afirmação, também resulta em várias perspectivas:

- Avaliar, por ensaios de fosforilação *in vitro*, se Kin3p é substrato para fosforilação da proteína Mre11, já que esta é a primeira proteína do complexo MRX a se posicionar no local da lesão. Da mesma forma, avaliar se Kin3 pode fosforilar as proteínas Mre11 e Xrs2 também através de ensaios de fosforilação *in vitro*;
- Realizar ensaios de mutagênese sítio-dirigida, substituindo o ácido aspártico da posição 55 por um aminoácido neutro (como a glicina) e avaliar a resposta a lesões no DNA, assim como a interação com as proteínas do complexo MRX. Além disso, utilizando mutagênese sítio-dirigida, retirar a sequência de serinas e treoninas entre as posições 247-256 (TYVGTPYYMS), provável sítio de fosforilação de Kin3, e da mesma forma avaliar a resposta a lesões no DNA e a interação com o complexo MRX;
- Avaliar a formação de quebras duplas no DNA formada, nas linhagens *kin3Δ* e selvagem, após tratamento com MMS, cisplatina, doxorubicina e HN2, utilizando plasmídeos contendo quebra (*gap repair*). Realizar esta mesma avaliação nos duplos mutantes *kin3Δmre11Δ*, *kin3Δrad50Δ* e *kin3Δxrs2Δ*;
- Avaliar a expressão das proteínas Mre11, Rad50 e Xrs2 durante a resposta a estresse genotóxico induzido por formadores de ICL utilizando *imunoblotting*, na linhagem selvagem e na linhagem *kin3Δ*;

- Avaliar a expressão das cinases sinalizadoras Tel1 e Mec1, assim como das efetoras Chk1 e Rad53, nos simples e duplos mutantes nas proteínas do complexo MRX e Kin3, através de *imunoblotting* durante estresse genotóxico;
- Realizar ensaios de co-localização das proteínas do complexo MRX e Kin3, assim como das prováveis proteínas envolvidas nesta via de sinalização, durante estresse genotóxico utilizando microscopia fluorescente, identificando temporalmente a formação de *foci* no local da lesão;
- Avaliar a interação genética da proteína Kin3 e do complexo MRX com proteínas de reconhecimento de lesões induzidas por MMS (da via BER), ICL (da via NER) e com polimerases de síntese translesão, na resposta a estresse genotóxico.
- Analisar o efeito da superexpressão da proteína Kin3 em uma linhagem selvagem, com relação ao fenótipo de sensibilidade a agentes genotóxicos e perfil do ciclo celular.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## Referências bibliográficas

- ABUZEID, W.M.; JIANG, X.; SHI, G.; WANG, H.; PAULSON, D.; ARAKI, K.; JUNGREIS, D.; CARNEY, J.; O'MALLEY, B.W. Jr. & LI, D. Molecular disruption of RAD50 sensitizes human tumor cells to cisplatin-based chemotherapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(7): 1974-1985, 2009.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. 5a ed. Artmed Editora, 2010.
- ANDERSEN, P.L.; XU, F. & XIAO, W. Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Research*, 18(1): 162-173, 2008.
- ANDERSON, D.E.; TRUJILLO, K.M.; SUNG, P. & ERICKSON, H.P. Structure of the Rad50 x Mre11 DNA repair complex from *Saccharomyces cerevisiae* by electron microscopy. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(40): 37027-37033, 2001.
- ANDREASSEN, P.R.; LOHEZ, O.D. & MARGOLIS, R.L. G2 and spindle assembly checkpoint adaptation, and tetraploidy arrest: implications for intrinsic and chemically induced genomic instability. *Mutation Research*, 532(1-2): 245-253, 2003.
- AROYA, S.B. & KUPIEC, M. The Elg1 replication factor C-like complex: a novel guardian of genome stability. *DNA Repair*, 4(4): 409-417, 2005.
- ASHWELL, S. & ZABLUDOFF, S. DNA damage detection and repair pathways-recent advances with inhibitors of checkpoint kinases in cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 14(13): 4032-4037, 2008.
- ASSENMACHER, N. & HOPFNER, K.P. MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma*, 113(4): 157-166, 2004.
- BAE, J.B.; MUKHOPADHYAY, S.S.; LIU, L.; ZHANG, N.; TAN, J.; AKHTER, S.; LIU, X.; SHEN, X.; LI, L. & LEGERSKI, R.J. Snm1B/Apollo mediates replication fork collapse and S Phase checkpoint activation in response to DNA interstrand cross-links. *Oncogene*, 27(37): 5045-5056, 2008.
- BARTEK, J. & LUKAS, J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(6): 738-747, 2001.
- BARTEK, J.; LUKAS, C. & LUKAS, J. Checking on DNA damage in S phase. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(10): 792-804, 2004.
- BARTON, A.B.; DAVIES, C.J.; HUTCHISON, C.A. & KABACK, D.B. Cloning of chromosome I DNA from *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the FUN52 gene, whose product has homology to protein kinases. *Gene*, 117(1): 137-140, 1992.



BAUTE, J. & DEPICKER, A. Base excision repair and its role in maintaining genome stability. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 43(4): 239-276, 2008.

BELJANSKI, V.; MARZILLI, L.G. & DOETSCH, P.W. DNA damage-processing pathways involved in the eukaryotic cellular response to anticancer DNA cross-linking drugs. *Molecular Pharmacology*, 65(6): 1496-1506, 2004.

BOITEUX, S. & GUILLET, M. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*, 3(1): 1-12, 2004.

BOWERS, A.J. & BOYLAN, J.F. Nek8, a NIMA family kinase member, is overexpressed in primary human breast tumors. *Gene*, 328: 135-142, 2004.

BRANZEI, D. & FOIANI, M. Interplay of replication checkpoints and repair proteins at stalled replication forks. *DNA Repair*, 6(7): 994-1003, 2007.

BRANZEI, D. & FOIANI, M. Maintaining genome stability at the replication fork. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 11(3): 208-219, 2010.

BRANZEI, D. & FOIANI, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 9(4): 297-308, 2008.

BRANZEI, D. & FOIANI, M. The checkpoint response to replication stress. *DNA Repair*, 8(9): 1038-1046, 2009.

BRANZEI, D. & FOIANI, M. The Rad53 signal transduction pathway: Replication fork stabilization, DNA repair, and adaptation. *Experimental Cell Research*, 312(14): 2654-2659, 2006.

BRENDEL, M. & HENRIQUES, J.A. The *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. *Mutation Research*, 489(1): 79-96, 2001.

BROZOVIC, A.; DAMROT, J.; TSARYK, R.; HELBIG, L.; NIKOLOVA, T., HARTIG, C.; OSMAK, M.; ROOS, W.P.; KAINA, B. & FRITZ, G. Cisplatin sensitivity is related to late DNA damage processing and checkpoint control rather than to the early DNA damage response. *Mutation Research*, 670(1-2): 32-41, 2009.

BURKE, D.; DAWSON, D. & STEARNS, T. *Methods in Yeast Genetics a Cold Spring Harbour Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2000.

BURSCH, W.; KARWAN, A.; MAYER, M.; DORNETSHUBER, J.; FRÖHWEIN, U.; SCHULTE-HERMANN, R.; FAZI, B.; DI SANO, F.; PIREDDA, L.; PIACENTINI, M.; PETROVSKI, G.; FÉSÜS, L. & GERNER, C. Cell death and autophagy: cytokines, drugs, and nutritional factors. *Toxicology*, 254(3): 147-157, 2008.

CARBALLO, J.A. & CHA, R.S. Meiotic roles of Mec1, a budding yeast homolog of mammalian ATR/ATM. *Chromosome Research*, 15(5): 539-550, 2007.

CARDONE, J.M.; REVERS, L.F.; MACHADO, R.M.; BONATTO, D.; BRENDDEL, M. & HENRIQUES, J.A. Psoralen-sensitive mutant *pso9-1* of *Saccharomyces cerevisiae* contains a mutant allele of the DNA damage checkpoint gene MEC3. *DNA Repair*, 5(2): 163-171, 2006.

CARROZZA, M.J.; STEFANICK, D.F.; HORTON, J.K.; KEDAR, P.S. & WILSON, S.H. PARP inhibition during alkylation-induced genotoxic stress signals a cell cycle checkpoint response mediated by ATM. *DNA Repair*, 8(11): 1264-1272, 2009.

CHAMANKHAH, M. & XIAO, W. Formation of the yeast Mre11-Rad50-Xrs2 complex is correlated with DNA repair and telomere maintenance. *Nucleic Acids Research*, 27(10): 2072-2079, 1999.

CHEN, Y.; CHEN, P.L.; CHEN, C.F.; JIANG, X. & RILEY, D.J. Never-in-mitosis related kinase 1 functions in DNA damage response and checkpoint control. *Cell Cycle*, 7(20): 3194-3201, 2008.

CHEN, Y.; RILEY, D.J.; ZHENG, L.; CHEN, P.L. & LEE, W.H. Phosphorylation of the mitotic regulator protein Hec1 by Nek2 kinase is essential for faithful chromosome segregation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(51): 49408-49416, 2002.

COLDWELL, K.E.; CUTTS, S.M.; OGNIBENE, T.J.; HENDERSON, P.T. & PHILLIPS, D.R. Detection of Adriamycin-DNA adducts by accelerator mass spectrometry at clinically relevant Adriamycin concentrations. *Nucleic Acids Research*, 36(16): e100, 2008.

CHRISTMANN, M.; TOMICIC, M.T.; ROOS, W.P. & KAINA, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193(1-2): 3-34, 2003.

DALHUS, B.; LAERDAHL, J.K.; BACKE, P.H. & BJØRÅS, M. DNA base repair--recognition and initiation of catalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(6): 1044-1078, 2009.

D'AMOURS, D. & JACKSON, S.P. The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(5): 317-327, 2002.

DOLINSKI, K. & BOTSTEIN, D. Changing perspectives in yeast research nearly a decade after the genome sequence. *Genome Research*, 15(12): 1611-1619, 2005.

DOETSCH, P.W.; MOREY, N.J.; SWANSON, R.L. & JINKS-ROBERTSON, S. Yeast base excision repair: interconnections and networks. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 68: 29-39B, 2001.

DRONKERT, M.L. & KANAAR, R. Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutation Research*, 486(4): 217-47, 2001.

DUDÁS, A. & CHOVANEC, M. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutation Research*, 66(2): 131-167, 2004.

- EISEN, J.A. & HANAWALT, P.C. A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. *Mutation Research*, 435(3): 171-213, 1999.
- ELLISON, V. & STILLMAN, B. Opening of the clamp: an intimate view of an ATP-driven biological machine. *Cell*, 106(6): 655-660, 2001.
- EVANS, M.D.; DIZDAROGLU, M. & COOKE, M.S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*, 567(1): 1-61, 2004.
- FASULLO, M. & SUN, M. The *Saccharomyces cerevisiae* checkpoint genes RAD9, CHK1 and PDS1 are required for elevated homologous recombination in a *mec1* (ATR) hypomorphic mutant. *Cell Cycle*, 7(15): 2418-2426, 2008.
- FRANKENBERG-SCHWAGER, M.; KIRCHERMEIER, D.; GREIF, G.; BAER, K.; BECKER, M. & FRANKENBERG, D. Cisplatin-mediated DNA double-strand breaks in replicating but not in quiescent cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology*, 212(2-3): 175-184, 2005.
- FRIEDBERG, E.C. A brief history of the DNA repair field. *Cell Research*, 18(1): 3-7, 2008.
- FRIEDBERG, E.C.; MCDANIEL, L.D. & SCHULTZ, R.A. The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14(1): 5-10, 2004.
- FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W.; WOOD, R.D.; SCHULTZ, R.A. & ELLENBERGER, T. *DNA Repair and Mutagenesis*. 2a ed. American Society for Microbiology Press, 2006.
- FRY, A. The Nek2 protein kinase: a novel regulator of centrosome structure. *Oncogene*, 21(40): 6184-6194, 2002.
- FRY, A.M.; MERALDI, P. & NIGG, E.A. Centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators. *The EMBO Journal*, 17(2): 470-481, 1998.
- FRY, A.M. & NIGG, E.A. Cell cycle. The NIMA kinase joins forces with Cdc2. *Current Biology*, 5(10): 1122-1125, 1995.
- GALLEGO-SÁNCHEZ, A.; CONDE, F.; SAN SEGUNDO, P.; BUENO, A. Control of PCNA deubiquitylation in yeast. *Biochemical Society Transactions*, 38(Pt 1): 104-109, 2009.
- GAME, J.C. & CHERNIKOVA, S.B. The role of RAD6 in recombinational repair, checkpoints and meiosis via histone modification. *DNA Repair*, 8(4): 470-482, 2009.

GHOSAL, G. & MUNIYAPPA, K. The characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Mre11/Rad50/Xrs2 complex reveals that Rad50 negatively regulates Mre11 endonucleolytic but not the exonucleolytic activity. *Journal of Molecular Biology*, 372(4): 864-882, 2007.

GRALLERT, A. & HAGAN, I.M. *Schizosaccharomyces pombe* NIMA-related kinase, Fin1, regulates spindle formation and an affinity of Polo for the SPB. *The EMBO Journal*, 21(12): 3096-3107, 2002.

GRALLERT, B. & BOYE, E. The Gcn2 kinase as a cell cycle regulator. *Cell Cycle*, 6(22): 2768-2772, 2007.

GRENON, M.; GILBERT, C. & LOWNDES, N.F. Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Nature Cell Biology*, 3(9): 844-847, 2001.

GRENON, M.; MAGILL, C.P.; LOWNDES, N.F. & JACKSON, S.P. Double-strand breaks trigger MRX- and Mec1-dependent, but Tel1-independent, checkpoint activation. *FEMS Yeast Research*, 6(5): 836-847, 2006.

HANADA, K.; BUDZOWSKA, M.; MODESTI, M.; MAAS, A.; WYMAN, C.; ESSERS, J. & KANAAR, R. The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strand breaks. *The EMBO Journal*, 25(20): 4921-4932, 2006.

HARFE, B.D. & JINKS-ROBERTSON, S. DNA mismatch repair and genetic instability. *Annual Review of Genetics*, 34: 359-399, 2000.

HIETER P. The yeast genome and clinical genetics. *Clinical Genetics*, 54(2): 113-116, 1998.

HOEIJMAKERS, J.H. DNA damage, aging, and cancer. *The New England Journal of Medicine*, 361(15): 1475-1485, 2009.

HOPFNER, K.P.; CRAIG, L.; MONCALIAN, G.; ZINKEL, R.A.; USUI, T.; OWEN, B.A.; KARCHER, A.; HENDERSON, B.; BODMER, J.L.; MCMURRAY, C.T.; CARNEY, J.P.; PETRINI, J.H. & TAINER, J.A. The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature*, 418(6897): 562-566, 2002.

HORTON, J.K.; STEFANICK, D.F.; KEDAR, P.S. & WILSON, S.H. ATR signaling mediates an S-phase checkpoint after inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity. *DNA Repair*, 6(6):742-50, 2007.

HSIEH, P. & YAMANE, K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(7-8): 391-407, 2008.

- HÜBSCHER, U. DNA replication fork proteins. *Methods in Molecular Biology*, 521: 19-33, 2009.
- ISHIKAWA, K.; ISHII, H. & SAITO, T. DNA damage-dependent cell cycle checkpoints and genomic stability. *DNA and Cell Biology*, 25(7): 406-411, 2006.
- JACKSON, S.P. & BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267): 1071-1078, 2009.
- JIRICNY, J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(5): 335-346, 2006.
- JONES, D.G. & ROSAMOND, J. Isolation of a novel protein kinase-encoding gene from yeast by oligodeoxyribonucleotide probing. *Gene*, 90(1): 87-92, 1990.
- KAI, M. & WANG, T.S. Checkpoint responses to replication stalling: inducing tolerance and preventing mutagenesis. *Mutation Research*, 532(1-2): 59-73, 2003.
- KASTAN, M.B. & BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432(7015): 316-23, 2004.
- KAUFMANN, W.K. The human intra-S checkpoint response to UVC-induced DNA damage. *Carcinogenesis*, 31(5): 751-765, 2010.
- KOKURYO, T.; SENGA, T.; YOKOYAMA, Y.; NAGINO, M. & NIMURA, Y, HAMAGUCHI M. Nek2 as an effective target for inhibition of tumorigenic growth and peritoneal dissemination of cholangiocarcinoma. *Cancer Research*, 67(20): 9637-9642, 2007.
- KROGH, B.O.; LLORENTE, B.; LAM, A. & SYMINGTON, L.S. Mutations in Mre11 phosphoesterase motif I that impair *Saccharomyces cerevisiae* Mre11-Rad50-Xrs2 complex stability in addition to nuclease activity. *Genetics*, 171(4): 1561-1570, 2005.
- LAM, A.F.; KROGH, B.O. & SYMINGTON, L.S. Unique and overlapping functions of the Exo1, Mre11 and Pso2 nucleases in DNA repair. *DNA Repair*, 7(4): 655-62, 2008.
- LAMBERT, S.; FROGET, B. & CARR, A.M. Arrested replication fork processing: interplay between checkpoints and recombination. *DNA Repair*, 6(7): 1042-1061, 2007.
- LAVECCHIA, A.; DI GIOVANNI, C. & NOVELLINO, E. CDC25A and B dual-specificity phosphatase inhibitors: potential agents for cancer therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 16(15): 1831-1849, 2009.
- LAZZARO, F.; GIANNATTASIO, M.; PUDDU, F.; GRANATA, M.; PELLICOLI, A.; PLEVANI, P. & MUZI-FALCONI, M. Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair. *DNA Repair*, 8(9): 1055-1067, 2009.

LEE, M.Y.; KIM, H.J.; KIM, M.A.; JEE, H.J.; KIM, A.J.; BAE, Y.S.; PARK, J.I.; CHUNG, J.H. & YUN, J. Nek6 is involved in G2/M phase cell cycle arrest through DNA damage-induced phosphorylation. *Cell Cycle*, 7(17): 2705-2709, 2008.

LI, G.M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, 18(1): 85-98, 2008.

LINDAHL, T. & WOOD, R.D. Quality control by DNA repair. *Science*, 286 (5446): 1897-1905, 1999.

LISBY, M.; BARLOW, J.H.; BURGESS, R.C. & ROTHSTEIN, R. Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell*, 118(6): 699-713, 2004.

LISBY, M. & ROTHSTEIN, R. Choreography of recombination proteins during the DNA damage response. *DNA Repair*, 8(9): 1068-1076, 2009.

LIU, L.; LEE, J. & ZHOU, P. Navigating the nucleotide excision repair threshold. *American Journal of Physiology* (no prelo). DOI: 10.1002/jcp.22205

LIU, Y.; NAIRN, R.S. & VASQUEZ, K.M. Processing of triplex-directed psoralen DNA interstrand crosslinks by recombination mechanisms. *Nucleic Acids Research*, 36(14): 4680-4688, 2008.

MAH, L.J.; EL-OSTA, A. & KARAGIANNIS T.C. GammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*, 24(4): 679-86, 2010.

MAJKA, J. & BURGERS, P.M. The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 78: 227-60, 2004.

MAHJOUR, M.R.; TRAPP, M.L. & QUARMBY, L.M. NIMA-related kinases defective in murine models of polycystic kidney diseases localize to primary cilia and centrosomes. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(12): 3485-3489, 2005.

MANTIERO, D.; CLERICI, M.; LUCCHINI, G. & LONGHESE, M.P. Dual role for *Saccharomyces cerevisiae* Tel1 in the checkpoint response to double-strand breaks. *EMBO Reports*, 8(4): 380-387, 2007.

MCHUGH, P.J.; GILL, R.D.; WATERS, R. & HARTLEY, J.A. Excision repair of nitrogen mustard-DNA adducts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 27(16): 3259-3266, 1999.

MCHUGH, P.J. & SARKAR, S. DNA interstrand cross-link repair in the cell cycle: a critical role for polymerase zeta in G1 phase. *Cell Cycle*, 5(10): 1044-1047, 2006.

MCHUGH, P.J.; SONES, W.R.; HARTLEY, J.A. Repair of intermediate structures produced at DNA interstrand cross-links in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell Biology*, 20(10): 3425-3433, 2000.

MELIXETIAN, M.; KLEIN, D.K.; SØRENSEN, C.S. & HELIN, K. NEK11 regulates CDC25A degradation and the IR-induced G2/M checkpoint. *Nature Cell Biology*, 11(10): 1247-1253, 2009.

MELO, J.A.; COHEN, J. & TOCZYSKI, D.P. Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes Development*, 15(21): 2809-2821, 2001.

MEMISOGLU, A. & SAMSON, L. Base excision repair in yeast and mammals. *Mutation Research*, 451(1-2): 39-51, 2000.

MENIEL, V.; MAGANA-SCHWENCKE, N.; AVERBECK, D. & WATERS R. Preferential incision of interstrand cross-links induced by 8-methoxypsoralen plus UVA in yeast during the cell cycle. *Mutation Research*, 384(1): 23–32, 1997.

MERRY, C.; FU, K.; WANG, J.; YEH, I.J. & ZHANG, Y. Targeting the checkpoint kinase Chk1 in cancer therapy. *Cell Cycle*, 9(2): 279-283, 2010.

MUNIANDY, P.A.; LIU, J.; MAJUMDAR, A.; LIU, S.T. & SEIDMAN, M.M. DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 45(1): 23-49, 2010.

MURAKAMI, H.; BORDE, V.; NICOLAS, A. & KEENEY, S. Gel electrophoresis assays for analyzing DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* at various spatial resolutions. *Methods in Molecular Biology*, 557: 117-142, 2009.

NAHAS, S.A. & GATTI, R.A. DNA double strand break repair defects, primary immunodeficiency disorders, and radiosensitivity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 9(6): 510-516, 2009.

NAKANISHI, K.; YANG, Y.G.; PIERCE, A.J.; TANIGUCHI, T.; DIGWEED, M.; D'ANDREA, A.D.; WANG, Z.Q. & JASIN, M. Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(4): 1110–1115 2005.

NASSIRPOUR, R.; SHAO, L.; FLANAGAN, P.; ABRAMS, T.; JALLAL, B.; SMEAL, T. & YIN, M.J. Nek6 mediates human cancer cell transformation and is a potential cancer therapeutic target. *Molecular Cancer Research*, 8(5): 717-728, 2010.

NAVADGI-PATIL, V.M. & BURGERS, P.M. A tale of two tails: activation of DNA damage checkpoint kinase Mec1/ATR by the 9-1-1 clamp and by Dpb11/TopBP1. *DNA Repair*, 8(9): 996-1003, 2009.

NEVANLINNA, H. & BARTEK, J. The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. *Oncogene*, 25(43): 5912-5919, 2006.

NIEDERNHOFER, L.J.; ODIJK, H.; BUDZOWSKA, M.; VAN DRUNEN, E.; MAAS, A.; THEIL, A.F.; DE WIT, J.; JASPERS, N.G.; BEVERLOO, H.B.; HOEIJMAKERS, J.H. & KANAAR, R. The structure-specific endonuclease ERCC1-XPF is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Molecular Cell Biology*, 24(13): 5776-87, 2004.

NORBURY, C.J. & ZHIVOTOVSKY, B. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, 23: 2797-2808, 2004.

O'CONNELL, M.J.; KRIEN, M.J. & HUNTER, T. Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends in Cell Biology*, 13(5): 221-228, 2003.

OLIVER, S.G. From genomes to systems: the path with yeast. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*, 361(1467): 477-482, 2006.

O'REGAN, L.; BLOT, J. & FRY, A.M. Mitotic regulation by NIMA-related kinases. *Cell Division*, 2: 25, 2007.

OSMANI, A.H.; MCGUIRE, S.L. & OSMANI, S.A. Parallel activation of the NIMA and p34cdc2 cell cycle regulated protein kinases is required to initiate mitosis in *A. nidulans*. *Cell*, 67(2): 283-291, 1991.

OSMANI, A.H.; O'DONNELL, K.; PU, R.T. & OSMANI, S.A. Activation of the nimA protein kinase plays a unique role during mitosis that cannot be bypassed by absence of the *bimE* checkpoint. *The EMBO Journal*, 10(9): 2669-2679, 1991.

OSMANI, S.A.; ENGLE, D.B.; DOONAN, J.H. & MORRIS, N.R. Spindle formation and chromatin condensation in cells blocked at interphase by mutation of a negative cell cycle control gene. *Cell*, 52(2): 241-251, 1988.

OSMANI, S.A.; MAY, G.S.; MORRIS, N.R. Regulation of the mRNA levels of nimA, a gene required for the G2-M transition in *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Cell Biology*, 104(6): 1495-1504, 1987.

OSMANI, S.A. & YE X.S. Cell cycle regulation in *Aspergillus* by two protein kinases. *The Biochemical Journal*, 317( Pt 3): 633-641, 1996.

PARDO, B.; GÓMEZ-GONZÁLEZ, B. & AGUILERA, A. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(6): 1039-1056, 2009.

PASCUCCI, B.; RUSSO, M.T.; CRESCENZI, M.; BIGNAMI, M. & DOGLIOTTI, E. The accumulation of MMS-induced single strand breaks in G1 phase is recombinogenic in DNA polymerase beta defective mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 33(1): 280-288, 2005.

PELEGRINI, A.L.; MOURA, D.J.; BRENNER, B.L.; LEDUR, P.F.; MAQUES, G.P.; HENRIQUES, J.A.; SAFFI, J. & LENZ, G. Nek1 silencing slows down DNA repair and



blocks DNA damage-induced cell cycle arrest. *Mutagenesis* (no prelo). DOI:10.1093/mutage/geq026

PETRANOVIC, D. & NIELSEN, J. Can yeast systems biology contribute to the understanding of human disease? *Trends in Biotechnology*, 26(11): 584-590, 2008.

PICHIERRI, P. & ROSSELLI, F. The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *The EMBO Journal*, 23(5): 1178-1187, 2004.

POLCI, R.; PENG, A.; CHEN, P.L.; RILEY, D.J. & CHEN, Y. NIMA-related protein kinase 1 is involved early in the ionizing radiation-induced DNA damage response. *Cancer Research*, 64(24): 8800-8803, 2004.

PRAKASH, S.; JOHNSON, R.E. & PRAKASH, L. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, 74: 317-53, 2005.

PU, R.T.; XU, G.; WU, L.; VIERULA, J.; O'DONNELL, K.; YE, X.S. & OSMANI, S.A. Isolation of a functional homolog of the cell cycle-specific NIMA protein kinase of *Aspergillus nidulans* and functional analysis of conserved residues. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(30): 18110-18116, 1995.

PUTNAM, C.D.; JAEHNIG, E.J. & KOLODNER, R.D. Perspectives on the DNA damage and replication checkpoint responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*, 8(9): 974-982, 2009.

RALEIGH, J.M. & O'CONNELL, M.J. The G(2) DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *Journal of Cell Science*, 113(Pt 10): 1727-36, 2000.

ROBERTSON, A.B.; KLUNGLAND, A.; ROGNES, T. & LEIROS, I. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(6): 981-993, 2009.

ROUSE, J. & JACKSON, S.P. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science*, 297(5581): 547-51, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.R. & MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L.A.; UNSAL-KAÇMAZ, K. & LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73: 39-85, 2004.

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

SANTAMARÍA, D.; BARRIÈRE, C.; CERQUEIRA, A.; HUNT, S.; TARDY, C.; NEWTON, K.; CÁCERES, J.F.; DUBUS, P.; MALUMBRES, M. & BARBACID, M. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*, 448(7155): 811-815, 2007.

SCHMITT, E.; PAQUET, C.; BEAUCHEMIN, M. & BERTRAND, R. DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *Journal of Zhejiang University Science B*, 8(6): 377-397, 2007.

SCHWEITZER, B. & PHILIPPSSEN, P. NPK1, a nonessential protein kinase gene in *Saccharomyces cerevisiae* with similarity to *Aspergillus nidulans nimA*. *Molecular & General Genetics*, 234(1): 164-167, 1992.

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

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B. & KROKAN, H.E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research*, 531(1-2): 231-251, 2003.

SORENSEN, C.S.; MELIXETIAN, M.; KLEIN, D.K. & HELIN, K. NEK11: linking CHK1 and CDC25A in DNA damage checkpoint signaling. *Cell Cycle*, 9(3): 450-455, 2010.

SPENCER, D.M.; BILARDI, R.A.; KOCH, T.H.; POST, G.C.; NAFIE, J.W.; KIMURA, K.; CUTTS, S.M. & PHILLIPS, D.R. DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. *Mutation Research*, 638(1-2): 110-21, 2008.

STASZEWSKI, O.; NIKOLOVA, T. & KAINA, B. Kinetics of gamma-H2AX focus formation upon treatment of cells with UV light and alkylating agents. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49(9): 734-740, 2008.

STEININGER, S.; GOMEZ-PARAMIO, I.; BRASELMANN, H.; FELLERHOFF, B.; DITTBERNER, D.; ECKARDT-SCHUPP, F. & MOERTL, S. Xrs2 facilitates crossovers during DNA double-strand gap repair in yeast. *DNA Repair*, 7(9):1563-1577, 2008.

SUZUKI, K., KOKURYO, T.; SENG, T.; YOKOYAMA, Y. & NAGINO, M, HAMAGUCHI M. Novel combination treatment for colorectal cancer using Nek2 siRNA and cisplatin. *Cancer Science* (no prelo). DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01504.x

SURPILI, M.J.; DELBEN, T.M. & KOBARG, J. Identification of proteins that interact with the central coiled-coil region of the human protein kinase NEK1. *Biochemistry*, 42(51): 15369-76, 2003.

SYMINGTON, L.S. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(4): 630-670, 2002.

SZYJKA, S.J.; APARICIO, J.G.; VIGGIANI, C.J.; KNOTT, S.; XU, W.; TAVARÉ, S. & APARICIO, O.M. Rad53 regulates replication fork restart after DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Development*, 22(14): 1906-1920, 2008.

TRUJILLO, K.M.; ROH, D.H.; CHEN, L.; VAN KOMEN, S.; TOMKINSON, A. & SUNG, P. Yeast Xrs2 binds DNA and helps target Rad50 and Mre11 to DNA ends. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(49): 48957-48964, 2003.

TSANG, R.Y.; AL-FAYEA, T. & AU HJ. Cisplatin overdose: toxicities and management. *Drug Safety*, 32(12): 1109-1122, 2009.

TSUKAMOTO, Y.; MITSUOKA, C.; TERASAWA, M.; OGAWA, H. & OGAWA, T. Xrs2p regulates Mre11p translocation to the nucleus and plays a role in telomere elongation and meiotic recombination. *Molecular Biology of the Cell*, 16(2): 597-608, 2005.

UPADHYA, P.; BIRKENMEIER, E.H.; BIRKENMEIER, C.S. & BARKER, J.E. Mutations in a NIMA-related kinase gene, Nek1, cause pleiotropic effects including a progressive polycystic kidney disease in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(1): 217-221, 2000.

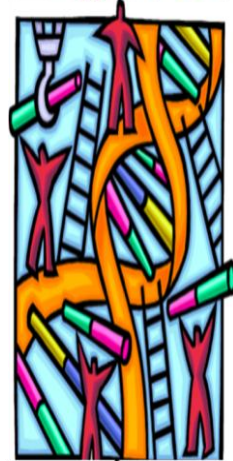
VAN ATTIKUM, H. & GASSER, S.M. The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(10): 757-765, 2005.

VASQUEZ, K.M. Targeting and processing of site-specific DNA interstrand crosslinks. *Environmental and Molecular Mutagenesis* (no prelo). DOI: 10.1002/em.20557

VENCLOVAS, C. & THELEN, M.P. Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes. *Nucleic Acids Research*, 28(13): 2481-2493, 2000.

WYATT, M.D. & PITTMAN, D.L. Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chemical Research in Toxicology*, 19(12): 1580-1594, 2006.

ZHAO J.; JAIN, A.; IYER R.R.; MODRICH, P.L. & VASQUEZ, K.M. Mismatch repair and nucleotide excision repair proteins cooperate in the recognition of DNA interstrand crosslinks. *Nucleic Acids Research*, 37(13): 4420-4429, 2009.



**ANEXOS**

## Anexo 1

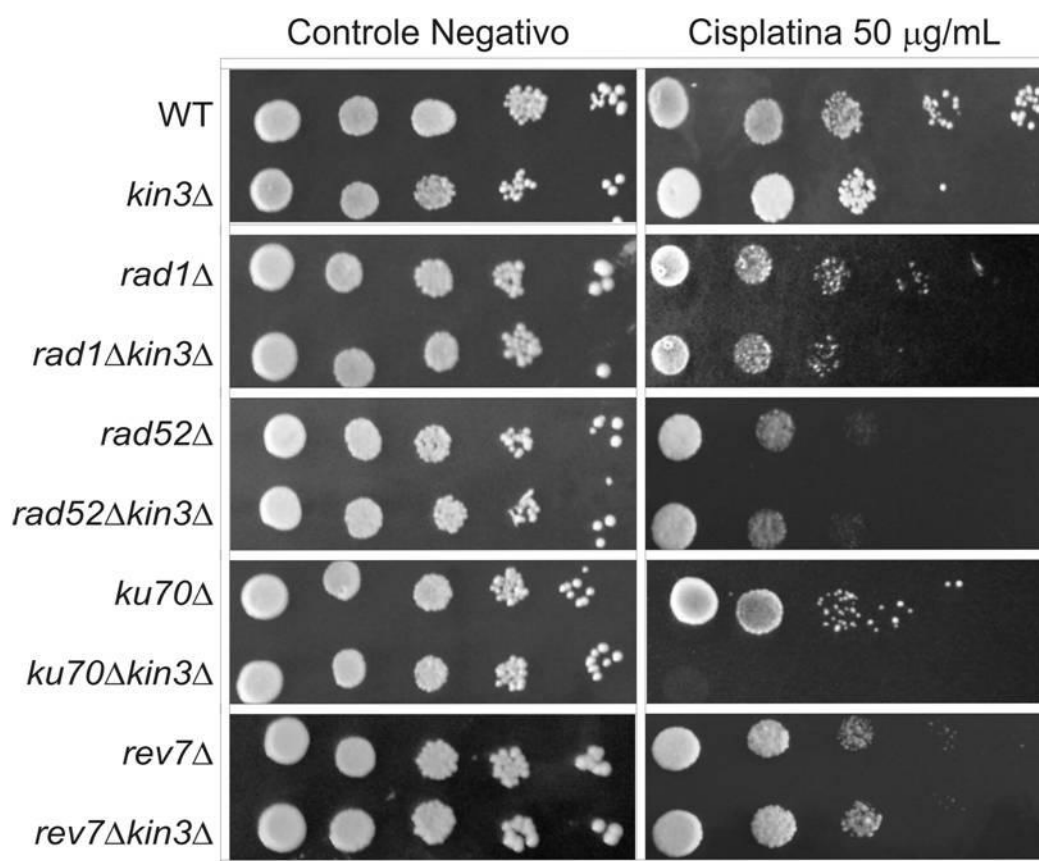


Figura 15. Teste de sensibilidade em mutantes representantes das vias NER, HR, NHEJ e TLS. Células em fase estacionária de crescimento foram adequadamente diluídas ( $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^3$ ) e plaqueadas em meio rico YPD, com ou sem cisplatina ( $50 \mu\text{g/mL}$ ). O mutante *rad1Δ* representa a via NER, o mutante *rad52Δ* a via HR, o mutante *ku70Δ* a via NHEJ e o mutante *rev7Δ* é deficiente em uma das subunidades da polimerase  $\zeta$ .

## Anexo 2

Mutagenesis Advance Access published May 25, 2010

Mutagenesis pp. 1–8, 2010

doi:10.1093/mutage/geq026

## Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle arrest

Alessandra Luíza Pelegrini<sup>1</sup>, Dinara Jaqueline Moura<sup>1</sup>,  
Bethânia Luise Brenner<sup>1</sup>, Pítia Flores Ledur<sup>1</sup>,  
Gabriela Porto Maques<sup>1</sup>,  
João Antônio Pegas Henriques<sup>1,2,3</sup>, Jenifer Saffi<sup>4</sup> and  
Guido Lenz<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biophysics, <sup>2</sup>Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, prédio 43421, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil, <sup>3</sup>Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, CEP 95070-560, Caixas do Sul, RS, Brazil and <sup>4</sup>Department of Basic Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Rua Sarmento Leite, 245, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

\*To whom correspondence should be addressed. Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, Avenida Bento Gonçalves 9500, Prédio 43431/sala 107, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +55 51 33087620; Fax: +55 51 33087003; Email: lenz@ufrgs.br

Received on December 16, 2009; revised on April 2, 2010;  
accepted on April 12, 2010

Never in mitosis A (NIMA)-related kinases (Nek) are evolutionarily conserved proteins structurally related to the *Aspergillus nidulans* mitotic regulator NIMA. Nek1 is one of the 11 isoforms of the Neks identified in mammals. Different lines of evidence suggest the participation of Nek1 in response to DNA damage, which is also supported by the interaction of this kinase with proteins involved in DNA repair pathways and cell cycle regulation. In this report, we show that cells with Nek1 knockdown (KD) through stable RNA interference present a delay in DNA repair when treated with methyl-methanesulfonate (MMS), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and cisplatin (CPT). In particular, interstrand cross links induced by CPT take much longer to be resolved in Nek1 KD cells when compared to wild-type (WT) cells. In KD cells, phosphorylation of Chk1 in response to CPT was strongly reduced. While WT cells accumulate in G<sub>2</sub>/M after DNA damage with MMS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Nek1 KD cells do not arrest, suggesting that G<sub>2</sub>/M arrest induced by the DNA damage requires Nek1. Surprisingly, CPT-treated Nek1 KD cells arrest with a 4N DNA content similar to WT cells. This deregulation in cell cycle control in Nek1 KD cells leads to an increased sensitivity to genotoxic agents when compared to WT cells. These results suggest that Nek1 is involved in the beginning of the cellular response to genotoxic stress and plays an important role in preventing cell death induced by DNA damage.

## Introduction

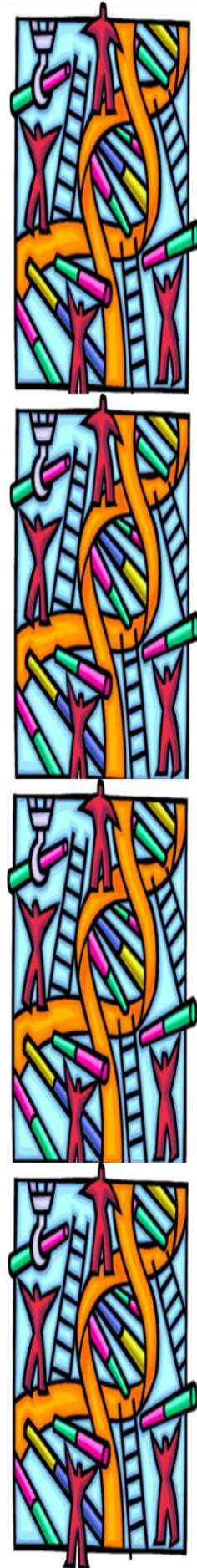
Nek1 is a member of the NIMA (Never in mitosis A)-related kinase (Nrk or Neks) family of serine/threonine kinases. In the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*, activation of a structurally related serine/threonine kinase, designated NIMA, plays a pivotal role in controlling entry into mitosis (1–3). Homology-based screens for NIMA genes in higher eukaryotes

have uncovered a large family of Neks and in mammals 11 Neks, Nek1 to Nek11, have been identified (4). All Neks have a conserved N-terminal kinase domain that have >40% of amino-acid similarity and with the exception of human Nek6, Nek7 and Nek10, possess a C-terminal non-catalytic regulatory domain. The length and composition of motifs in the C-terminal region vary considerably, with several protein–protein interaction and protein degradation motifs (4).

Nek1 has the largest non-catalytic C-terminus among mammalian Neks, with several coiled-coil domains, PEST and D-box degradation signals and both nuclear localization and export consensus sequences (4). These signatures suggest that Nek1 is a highly integrated and regulated protein. Accordingly, yeast two-hybrid assays using the central coiled-coil region of human Nek1 as bait identified 11 proteins, which include KIF3A (kinesin family member 3A), MRE11 (meiotic recombination 11), p53BP1 (p53 binding protein 1) and ATRX (alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) (5).

The interaction of Nek1 with proteins involved in DNA repair point to the importance of Nek1 in this process. The importance of Nek1 in DNA repair has been characterized most thoroughly in response to ionizing radiation (IR) (6). This kind of DNA damaging agent induces predominantly double-strand breaks (DSBs), which in mammals are repaired mainly by non-homologous end joining (NHEJ) and to a lesser extent by homologous recombination (HR) involving proteins already shown to interact with Nek1, such as MRE11, p53BP1 and ATRX (5,7,8). IR exposure leads to nuclear localization of Nek1 in discrete nuclear points, possibly in double-strand DNA break sites, as well as increasing Nek1 expression and activity (6). Lack of Nek1 prevented G<sub>1</sub>/S or G<sub>2</sub>/M phase arrest in response to IR, as well as phosphorylation of Chk1 and 2 (9). Therefore, Nek1 was suggested as a kinase located at the early steps of IR-induced DNA damage signalling.

In the present report, we show that Nek1 is important in the cellular response to the genotoxic agents methyl methanesulfonate (MMS), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and cisplatin (CPT), which induce diverse DNA lesions and activate various repair mechanisms. MMS is a monofunctional alkylating agent that covalently reacts with only one nucleophilic center in DNA, modifying guanine to 7-methylguanine and adenine to 3-methyladenine, causing the incorrect pairing of the bases and blocking replication (10). Methyl groups can be directly removed by DNA alkyl transferase or repaired by base excision repair (BER) (11). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produces reactive oxygen species (ROS) resulting in apurinic or apirimidinic sites that are repaired by BER (12). ROS also induces single- and double-stranded DNA breaks, which may recruit several repair mechanisms which include HR, NHEJ, mismatch repair, translesion synthesis and transcription-coupled repair (13). CPT treatment induces formation of DNA intra and interstrand cross links (ICLs), DNA–protein cross links and monoadducts with DNA (14). ICLs represent a small amount of the total CPT lesions



***CURRICULUM  
VITAE***

**MOURA, D.J.****1. Dados Pessoais**

**Nome:** Dinara Jaqueline Moura

**Nascimento:** 20 de outubro de 1979 – Santo Augusto, Rio Grande do Sul, Brasil

**Endereço Profissional:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Departamento de Biofísica, Prédio 43422, Sala 210

Avenida Bento Gonçalves, 9500

Bairro Agronomia – Porto Alegre, RS, Brasil

**Endereço eletrônico:** [dddinja@hotmail.com](mailto:dddinja@hotmail.com)

**2. Formação**

**2004 - 2006:** Mestrado em Biologia Molecular e Celular

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Título: Estudo dos alcalóides beta-carbolínicos em diferentes modelos biológicos.

Orientadora: Jenifer Saffi.

**1998 - 2002:** Graduação em Farmácia

Universidade Regional do Noroeste do estado do Rio Grande do Sul, Unijuí

Ijuí, Rio Grande do Sul, Brasil

**3. Estágios**

**2003 – 2004:** Estágio Voluntário

Laboratório de Reparação de DNA de eucariontes da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientação: Jenifer Saffi

Atividades: desenvolvimento de metodologias relacionadas a cultivo e manipulação de leveduras, manipulação de células de mamífero e ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade

**2004 – 2006:** Apóio Técnico

Laboratório de Reparação de DNA de eucariontes da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientação: João Antonio Pêgas Henriques

Atividades: realização de experimentos de rotina no laboratório de cultivo de leveduras, compras de materiais de laboratório e coordenação de bolsistas.



#### 4. Artigos completos publicados

1. MOURA, D.J.; CASTILHOS, B.; IMMICH, B.F.; CAÑEDO, A.D.; HENRIQUES, J.A.P.; LENZ, G. & SAFFI, J. Kin3 protein, a NIMA-related kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, is involved in DNA damage response. *Cell Cycle* (no prelo).
2. PELEGRINI, A.L.; MOURA, D.J.; BRENNER, B.L.; LEDUR, P.F.; MARQUES, G.P.; HENRIQUES, J.A.P.; SAFFI, J. & LENZ, G. Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle arrest. *Mutagenesis* (no prelo). DOI:10.1093/mutage/geq026
3. MACHADO, M.S.; VILLELA, I.V.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; SALVADOR, M.; LOPES, N.P.; BRAGA, A.L.; ROESLER, R.; SAFFI, J. & HENRIQUES, J.A.P. 3'3'-Ditrifluoromethyldiphenyl diselenide: A new organoselenium compound with interesting antigenotoxic and antimutagenic activities. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 673: 133-140, 2009.
4. PÉRES, V.F.; MOURA, D.J.; SPEROTTO, A.R.M.; DAMASCENO, F.C.; CARAMÃO, E.B.; ZINI, C.A. & SAFFI, J. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 2389-2395, 2009.
5. BEZERRA, D.P.; VASCONCELLOS, M.C.; MACHADO, M.S. ; VILLELA, I.V. ; ROSA, R.M.; MOURA, D.J.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R. ; LIMA, M.A.; AQUINO, N.C.; HENRIQUES, J.A.P.; SAFFI, J. & COSTA-LOTUFO, L.V. Piplartine induces genotoxicity in eukaryotic but not in prokaryotic model systems. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 677: 133-140, 2009.
6. BEZERRA, D.P.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; VASCONCELLOS, M.C.; SILVA, A.C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.; HENRIQUES, J.A.; COSTA-LOTUFO, L.V. & SAFFI, J. Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. *Mutation Research*, 652(2): 164-74, 2008.
7. MIORELLI, S.T.; ROSA, R.M.; MOURA, D.J.; ROCHA, J.C.; CARNEIRO LOBO, L.A.; PEGAS HENRIQUES, J.A.P. & SAFFI, J. Antioxidant and anti-mutagenic effects of ebselen in yeast and in cultured mammalian V79 cells. *Mutagenesis*, 23: 93-99, 2008.
8. DA COSTA MEDINA, L.; VIAU, C.; MOURA, D.J.; SAFFI, J.; STEFANI, V.; BRANDELLI, A. & HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of aminohydroxynaphthoquinones in bacteria, yeast, and Chinese hamster lung fibroblast cells. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 650: 140-149, 2008.
9. FRAGOSO, V.; NASCIMENTO, N.; MOURA, D.J.; SILVA, A.C.R.; RICHTER, M.F.; SAFFI, J. & FETT-NETO, A. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. *Toxicology in Vitro*, 22(3):559-66, 2008.
10. CAVALCANTI, B.; MOURA, D. J.; ROSA, R.M.; MORAES, M.; ARAUJO, E.; LIMA, M.; SILVEIRA, E.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. & PESSOA, C. Genotoxic effects of tanshinones from *Hyptis martiusii* in V79 cell line. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 388-392, 2008.
11. CANNES, N.N.; FRAGOSO, V.; MOURA, D.J.; SILVA, A.C.R.; FETT-NETO, A.G. & SAFFI, J. Antioxidant and antimutagenic effects of the crude foliar extract and the alkaloid

brachycerine of *Psychotria brachyceras*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48: 728-734, 2007.

12. ROSA, R.M.; MOURA, D.J.; SILVA, A.C.R.; SAFFI, J. & HENRIQUES, J.A.P. Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 631: 44-54, 2007.

13. MOURA, D.J.; RICHTER, M.F.; BOEIRA, J.M.; HNERIQUES, J.A.P. & SAFFI, J. Antioxidant properties of b-carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis*, 22: 293-302, 2007.

14. ROSA, R.M.; MOURA, D.J.; MELECCHI, M.I.S.; SANTOS, R.S.; RICHTER, M.F.; CAMARÃO E.B.; HENRIQUES, J.A.P.; RAMOS A.L.L.P. & SAFFI, J. Protective effects of *Hibiscus tiliaceus* L. methanolic extract to V79 cells against cytotoxicity and genotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl-hydroperoxide. *Toxicology in Vitro*, 21: 1442-1452, 2007.

15. CAVALCANTI, B.C.; LOTUFO, L.V.C.; MORAES, M.O.; BURBANO, R.R.; SILVEIRA, E.R.; CUNHA, K.M.A.; RAO, V.S.N.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; HENRIQUES, J.A.P. & PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in copaiba oil. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 388-392, 2006.

16. MOURA, D.J.; RORIG, C.; VIEIRA, D.L.; HENRIQUES, J.A.P.; ROESLER, R.; SAFFI, J. & BOEIRA, J.M. Effects of beta-carbolines alkaLoids on the recognition object task in mice. *Life Sciences*, 79: 2099-2104, 2006.

## 5. Resumos e trabalhos apresentados em Congressos

1. MOURA, D.J.; CASTILHOS, B.; CAÑEDO, A.D.; HENRIQUES, J.A.P.; LENZ, G. & SAFFI, J. Kin3p, a NIMA-related kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, is involved in DNA adduct damage response. In: X Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2009, Ouro Preto. Resumos X Congresso da SBMCTA, 2009.

2. ROCHA, J.C.; MOURA, D.J.; IMMICH, B.F.; HENRIQUES, J.A.P.; LENZ, G. & SAFFI, J. NIMA-related kinase Kin3p interacts with the MRX complex in *Saccharomyces cerevisiae*. In: X Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2009, Ouro Preto - MG. Resumos do X Congresso da SBMCTA, 2009.

3. ARIGONY A.L.; LAMBERT A.P.F.; MOURA, D.J.; LEMOS M.A.; SILVA J.A.S.; LAMBERT B.F.; LUBIANCA J.; BONATTO D.; MACHADO D.C. & HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of neuronal induction in adipose derived stem cells in vitro. In: X Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2009, Ouro Preto - MG. Resumos do X Congresso da SBMCTA, 2009.

4. SPEROTTO, A.R.M.; MOURA, D.J.; PÉRES, V.F.; HENRIQUES, J.A.P. & SAFFI, J. Avaliação do efeito citotóxico e mutagênico do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* KUNTH e do seu componente majoritário nerolidol em *Saccharomyces cerevisiae*. In: X Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2009, Ouro Preto - MG. Resumos do X Congresso da SBMCTA, 2009.

5. CASTILHOS, B.; MOURA, D.J.; IMMICH, B.F.; HENRIQUES, J.A.P.; LENZ, G. & SAFFI, J. Avaliação da expressão do gene KIN3 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando o plasmídeo repórter pMELbeta2 e RT-PCR semi-quantitativo. In: XXI Salão de Iniciação Científica - XVIII Feira de Iniciação Científica - IV Salão UFRGS Jovem, 2009, Porto Alegre. Resumos do XXI Salão de Iniciação Científica - XVIII Feira de Iniciação Científica - IV Salão UFRGS Jovem, 2009.
6. IMMICH, B.F.; MOURA, D.J.; ROCHA, J.C.; HENRIQUES, J.A.P.; LENZ, G. & SAFFI, J. Interação da proteína Kin3 de *Saccharomyces cerevisiae* com proteínas do complexo MRX utilizando o sistema duplo-híbrido de levedura. In: XXI Salão de Iniciação Científica - XVIII Feira de Iniciação Científica - IV Salão UFRGS Jovem, 2009, Porto Alegre - RS. Resumos do XXI Salão de Iniciação Científica - XVIII Feira de Iniciação Científica - IV Salão UFRGS Jovem, 2009.
7. CASTILHOS, B.; MOURA, D.J.; AMORIN H. & SAFFI, J. Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de duas bases de Tröger em células de mamífero. In: XV Salão de Iniciação Científica - IX Fórum da Pesquisa, 2009, Canoas - RS. Resumo do XV Salão de Iniciação Científica - IX Fórum da Pesquisa - ULBRA, 2009.
8. PELEGRINI, A.L.; MARQUES, G.P.; MOURA, D.J.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P. & LENZ, G. O silenciamento da Nek1 altera a reparação do DNA de células HEK293T tratadas com cisplatina. In: XI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009, Porto Alegre. Livro de Resumos PPGBCM, 2009.
9. IMMICH, B.F.; ROCHA, J.C.; MOURA, D.J.; CASTILHOS, B.; SPEROTTO, A.R.M.; HENRIQUES, J.A.P.; LENZ, G. & SAFFI, J. Avaliação da interação do gene KIN3 com genes de sinalização e reparo de DNA em *Saccharomyces cerevisiae*. In: I Encontro Gaúcho de Micologia, 2008, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2008.
10. MOURA, D.J. ; CASTILHOS, B.; IMMICH, B.F.; CAÑEDO, A.D.; HENRIQUES, J.A.P.; LENZ, G. & SAFFI, J. Study of the *Saccharomyces cerevisiae* Kin3 protein in DNA damage response. In: I Encontro Gaúcho de Micologia, 2008, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2008. p. 94-94.
11. CASTILHOS, B.; MOURA, D.J.; CAÑEDO, A.D.; HENRIQUES, J.A.P.; LENZ, G. & SAFFI, J. . Envolvimento da cinase Kin3 de *Saccharomyces cerevisiae* na progressão de ciclo celular em condições de estresse genotóxico. In: XX Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2008, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2008.
12. IMMICH, B.F.; ROCHA, J.C.; MOURA, D.J.; SPEROTTO, A.R.M.; HENRIQUES, J. A.P.; LENZ, G. & SAFFI, J. Avaliação da interação do gene KIN3 com genes de sinalização e reparo de DNA em *Saccharomyces cerevisiae*. In: XX Salão de iniciação Científica UFRGS, 2008, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2008.
13. SPEROTTO, A.R.M.; PÉRES, V.F.; MOURA, D. J. & SAFFI, J. Avaliação do efeito citotóxico e genotóxico do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth. In: XX Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2008, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2008.
14. MOURA, D.J.; CAÑEDO, A.D.; IMMICH, B.F.; CASTILHOS, B.; HENRIQUES, J. A.P.; LENZ, G. & SAFFI, J. Study of the *Saccharomyces cerevisiae* Kin3 protein in DNA damage response. In: 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador. Livro de Resumos, 2008. p. GM233-GM233.
15. FILLIPIN, L.I.; GNIESLAW, P.; SCHIMIDT, P.; MOURA, D.J.; CORREA, C.C.F.; SAFFI, J.; MARRONI, N.P. & XAVIER, R.M. An antagonist of bombesin/gastrin releasing peptide

receptor (RC3095) as an inhibitor of the oxidative damage in muscle adjacent to inflamed joints. In: XXIII Reunião Anual Fesbe, 2008, Águas de Lindóia. Livro de Resumos, 2008. p. ID1745-2-ID1745-2.

16. RICHTER, M.F.; MOURA, D.J.; PACHECO, L.S.; CERESER, L.S.; MARCOLIN, E.; SAITO, S.; MARRONI, N.P.; MELECHI, M.I.S. & SAFFI, J. Determination of the in vitro antioxidant potential of plant extracts (*Costus spicatus* and *Croton cajuara*) or pure compound (alkaloids and flavonoids) by HPLC. In: International Conference of Oxidative Stress Havana-Redox 2007, 2007, Cuba. Revista Cubana de Farmacia. Cuba: University of Havana and Cuba society of Pharmacology, 2007. v. 41. p. 49.

17. MOURA, D.J.; SILVA, A.C.R.; RICHTER, M.F.; HENRIQUES, J.A.P. & SAFFI, J. Antimutagenic and antigenotoxic activities of beta-carboline alkaloids. In: Free Radicals in Montevideo 2007 - V Meeting of SFRBM - South American group, V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, 2007, Montevideo. Book of Abstracts. Montevideo - Uruguay: Imprenta Grega, 2007. p. 124.

18. SILVA, A.C.R.; MOURA, D.J.; FRAGOSO, V.; CANNES, N.N.; FETT-NETO, A.G. & SAFFI, J. Antioxidant and antimutagenic effects of the crude foliar extracts and the alkaloids psychollatine and brachycerine of *Psychotria umbellata* vel and *Psychotria brachyceras*, respectively. In: Free Radicals in Montevideo 2007 - V Meeting of SFRBM - South American Group, V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, 2007, Montevideo. Book of Abstracts. Montevideo: Imprenta Grega, 2007. p. 124.

19. SILVA, A.C.R.E.; MOURA, D.J.; ROCHA, J.C.; LENZ, G. & SAFFI, J. Interação genética entre o gene KIN3 e os genes do complexo MRX de *Saccharomyces cerevisiae*. In: XIX Salão de Iniciação Científica, XVI Feira de Iniciação Científica, II Salão UFRGS Joven - UFRGS, 2007, Porto Alegre. Livro de Resumos. Porto Alegre: Editora da Ufrgs, 2007. v. 2. p. 381

20. BRENNER, B.L.; PELEGRINI, A.L.; MOURA, D. J.; SAFFI, J. & LENZ, G. Células com a cinase Nek1 silenciada apresentam maior sensibilidade a agentes mutagênicos. In: XIX Salão de Iniciação Científica, XVI Feira de Iniciação Científica, II Salão UFRGS Joven - UFRGS, 2007, Porto Alegre. Livro de Resumos. Porto Alegre: Editora da Ufrgs, 2007. V. 2. P. 378-379.

21. VASCONCELLOS, M.C.; ROSA, R.M.; MOURA, D.J.; FONSECA, A.M.; LEMOS, T.L.G.; MORAES, M.E.A.; MONTENEGRO, R.C.; SAFFI, J. & MORAES, M.O. Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity of an 0-naphthoquinone from roots of *Capraria biflora*, in several biological models. In: VIII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2007, Angra do Reis. Revista Brasileira de Toxicologia. São Paulo: Suprema Gráfica e Editora, 2007. v. 20. p. 35.

22. BEZERRA, D.P.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; VASCONCELLOS, M.C.; SILVA, A.C.R.; SILVEIRA, E.R.; MORAES, M.O.; HENRIQUES, J.A.P.; LOTUFO, L.V.C. & SAFFI, J. Evaluation of the genotoxicity of pipartine, an alkaloid amides from *Piper tuberosum*, in several biological model. In: VIII Congresso Brasileiro de Mutagênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2007, Mangaratiba. Revista Brasileira de Toxicologia. São Paulo: Editora Suprema, 2007. v. 20. p. 36.

23. CAVALCANTI, B.C.; SOMBRA, C.M.L.; ROSA, R.M.; MOURA, D.J.; SAFFI, J.; LOTUFO, L.V.C.; HENRIQUES, J.A.P.; MORAES, M.O. & PESSOA, C. Studies on the genotoxic and mutagenic effects of kaurenoic acid from *Copaifera Langsdorffii* desf.. In: VIII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2007, Mangaratiba. Revista Brasileira de Toxicologia. São Paulo: Suprema, 2007. v. 20. p. 36.

24. PELEGRINI, A. L.; BRENNER B.L.; MOURA, D.J.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P. & LENZ, G. O silenciamento da Nek1 provoca o aumento no índice de dano ao material genético de células expostas a agentes mutagênicos. In: 53° Congresso Brasileiro de Genética, 2007, Águas de Lindóia SP. Livro de Resumos do 53° Congresso Brasileiro de Genética, 2007. p. 27.
25. TAMIOSSO, V.; PÉRES, V.F.; SILVA, P.P.; RICHTER, M.F.; MOURA, D.J. & SAFFI, J. Avaliação da capacidade antioxidante de diferentes extratos de *Piper gaudichaudianun kunth*. In: XIX Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2007, Porto Alegre. Resumos do XIX Salão de Iniciação Científica UFRGS. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2007. p. 630.
26. PELEGRINI, A.L.; BRENNER B.L.; MOURA, D.J.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P. & LENZ, G. O silenciamento da nek1 provoca o aumento no índice de dano ao material genético de células expostas a agentes mutagênicos. In: IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2007, Porto Alegre. Livro de Resumos - IX Reunião Anual do PPGBCM, 2007. p. 22.
27. SILVA, A.C.R.; MOURA, D.J.; HENRIQUES, J.A.P.; LENZ, G. & SAFFI, J. Sensibilidade da linhagem kin3/nek1 de *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes agentes mutagênicos. In: XVII Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2006, Porto Alegre, 2006.
28. MEDINA, L.F.; MOURA, D.J.; STEFANI, V.; BRANDELLI, A. & HENRIQUES, J.A.P. Analysis of differential cytotoxicity of aminonaphthoquinones in bacteria and yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: 25 Reunião de Genética de Microorganismos, 2006, São Pedro, 2006.
29. ROSA, R.M.; MOURA, D.J.; HOCH, N.; BRAGA, A.L.; SAFFI, J. & HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicidade do diseleneto de difenila em fibroblastos de pulmão de hamster chinês - linhagem V79. In: I encontro sobre Selênio e Telúrio, 2006, Bento Gonçalves. Livro de Resumos, 2006. p. 34-34.
30. BRENNER B.L.; PELEGRINI, A.L.; FIRPO, C.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P. & LENZ, G. O silenciamento da cinase humana Nek1 em células Hek293T altera o reparo normal de danos ao DNA. In: XVII Salão de Iniciação científica, XV Feira de Iniciação Científica - UFRGS, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2006.
31. PELEGRINI, A.L.; BRENNER B.L.; FIRPO, C.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P. & LENZ, G. O silenciamento da cinase humana Nek1 altera o reparo normal de danos ao DNA induzidos por agente alquilante. In: 52 Congresso Brasileiro de Genética, 2006, Foz do Iguaçu. Livro de Resumos - 52 Congresso Brasileiro de Genética, 2006. p. 1439-1439.
32. ROSA, R.M.; MOURA, D.J.; PICADA, J.N.; SAFFI, J. & HENRIQUES, J.A.P. Efeito pró-oxidante do diseleneto de difenila em cultura de fibroblasto de hamster chinês. In: VII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2005, Natal - RN. Genetics and Molecular Biology, 2005. v. 28. p. 72.
33. MOURA, D.J.; MACEDO, B.C.; SZTROMOWSKI, K.; HENRIQUES, J.A.P. & SAFFI, J. Genotoxic effects of beta-carbolines and relationship structures activity using comet assay. In: VII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2005, Natal - RN. Genetics and Molecular Biology, 2005. v. 28. p. 74.
34. MACEDO, B.C.; MOURA, D.J.; HENRIQUES, J.A.P. & SAFFI, J. Mutagenic effect of harmol, harmaline and harmalol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: VII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2005, Natal - RN. Genetics and molecular biology, 2005. v. 28. p. 75.