

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

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES DO GENE *PSO2* DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
COM GENES DA RESPOSTA A DANOS NO DNA APÓS TRATAMENTO COM
AGENTES INDUTORES DE PONTES INTERCADEIA**

TESE DE DOUTORADO

FERNANDA MOSENA MUNARI

Porto Alegre, 2013.

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

ESTUDO DAS INTERAÇÕES DO GENE *PSO2* DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* COM
GENES DA RESPOSTA A DANOS NO DNA APÓS TRATAMENTO COM AGENTES
INDUTORES DE PONTES INTERCADEIA

Fernanda Mosena Munari

Tese submetida ao Programa de Pós-
graduação em Biologia Celular e Molecular da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como requisito para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Porto Alegre, fevereiro de 2013.



“From its very beginning, life has faced the fundamental problem that the form in which genetic information is stored is not chemically inert.”

“Desde o seu início, a vida tem enfrentado o problema fundamental de que a forma na qual a informação genética é armazenada não é quimicamente inerte.”

Errol C. Friedberg

"Todas as vitórias ocultam uma abdicação".

Simone de Beauvoir

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Radiobiologia Molecular do Centro de Biotecnologia e no Laboratório de Reparação de DNA de Eucariotos do Departamento de Biofísica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O projeto foi subsidiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo PRONEX/FAPERGS/CNPq (nº 10/0044-3) e pelo Laboratório de Genotoxicidade/Instituto Royal do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (GENOTOX/ROYAL).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. João A. P. Henriques, pela confiança e oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos que somente uma pessoa cuja vida é dedicada à ciência pode transmitir, e por toda sua compreensão durante o período final de desenvolvimento desta Tese.

À CAPES pela bolsa concedida para a realização deste doutorado.

Ao CNPq e à FAPERGS pelo apoio financeiro na realização deste projeto.

Aos professores do PPGBCM pela competência, e em especial ao Prof. Carlos Termignoni por fazer parte da minha Comissão de Acompanhamento.

Ao Dr. Luis F. Revers, que muito contribuiu para este trabalho e também participou da minha Comissão de Acompanhamento.

À Dra. Temenouga Guecheva, a querida Nucha, pela presteza e auxílio na elaboração desta Tese.

À Profa. Dra. Jaqueline Picada, pela revisão desta tese.

Aos professores Dr. Guido Lenz (UFRGS), Dr. Álvaro Leitão (UFRJ), Dr. Daniel Prá (UNISC) e Dr. Henrique B. Ferreira (UFRGS - membro suplente), que compuseram a banca avaliadora desta tese.

Às colegas que me receberam no Lab. 219 do CBiot, Dra. Jacqueline Cardone e Dra. Cassiana Viau, pelos ensinamentos iniciais sobre o ‘mundo das leveduras’.

Aos colegas de várias fases do Lab. 219: Renata e Fabrício, pelos ensinamentos, convivência e em especial ao carinho da Rê; Lavínia, Juliana, Orlando e Elvira, pela convivência, incentivo e companhia, inclusive para sair tarde do campus do Vale após experimentos nem sempre bem sucedidos.

Aos colegas de diferentes épocas do Lab. 210 da Biofísica: Dinara, pelos ensinamentos, pelo exemplo de dedicação e ajuda no planejamento de experimentos; Albanin, pelos conselhos oportunos e exemplo de eficiência; Diana, Michelle e Larissa, pelas aventuras compartilhadas no mundo do *Western Blot*; Cristiano, André, Lauren, Patrícia, Iuri, Victória, Grethel, Juliane, Ana Arigony, Bruna C., Bruna I., Tatiana, Clara, pela ótima convivência e pelos conhecimentos compartilhados.

À Márcia Vaz, secretária do Prof. Henriques, por sua habilidade em gerenciar as compras, pagamentos, agendamentos de reuniões, etc..., sempre com um sorriso no rosto.

Ao Jomar e à Claudia Laurino, ao Rodrigo Carlessi e à Gabrielle Salton, por toda a jornada científica que fizemos juntos, que contribuiu muito para a minha formação profissional e pessoal.

À Sílvia e ao Luciano, secretários do PPGBCM, pela rapidez e qualidade de seus serviços, e em especial ao alto-astral contagiante da Silvinha.

Ao Sr. Milton, técnico de lavagem e esterilização de materiais do CBiot, pela sua dedicação, eficiência e carinho.

Aos funcionários da limpeza e segurança do CBiot, em especial à Dona Maria, que deixava o laboratório 219 brilhando, sempre com muita alegria e gosto pelo seu ofício.

Aos amigos Patrícia Giovanella e André Schnorr (*in memmorian*), obrigada pelas várias saídas para destilar alguns momentos complicados e lavar a alma com muitas risadas, piadas sem graça e trocadilhos não muito inspirados, para depois voltar à realidade das batalhas da vida.

À amiga Patrícia Almeida, pela companhia, pela torcida e pela cafeteira expressa, que foi muito útil no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Alexandre Gaspodini, que sempre me ouviu nos momentos difíceis e comemorou comigo cada conquista. Obrigada pelo carinho e incentivo, pelos ótimos momentos de lazer no mundo da música, além do apoio gastronômico!

À Telma Gaspodini, pelo carinho, incentivo e pelas boas energias.

A meus pais, Dirceu e Marlene, pela generosidade e capacidade de doação, sem as quais eu não teria chegado até aqui, obrigada pelo apoio incondicional. Vocês são maravilhosos!

Ao meu irmão Maurício e minha cunhada Janaína, pelo incentivo, pelos momentos em família (incluindo aí a família da Jana) e pela convivência nos ótimos momentos de lazer que vocês me proporcionaram nesse período que eu passei “d’outro lado”.

E, finalmente, às oportunidades que a vida vai me trazendo, ora em forma de energias sutis, ora em forma de grandes mudanças, que acabam sempre por me conduzir à realidade imaginada.

Agradeço imensamente!

ESTRUTURAÇÃO DA TESE

A presente tese encontra-se estruturada da seguinte forma: uma introdução geral, os objetivos, os dois capítulos principais escritos na forma de artigos científicos (conforme as normas das revistas para as quais foram submetidos), um capítulo com resultados complementares, uma discussão geral dos resultados, as conclusões e as perspectivas.

A introdução aborda alguns conceitos importantes para o entendimento dos processos de formação e reparação de quebras duplas no DNA de eucariotos, tais como os tipos de agentes indutores de pontes intercadeia no DNA, os tipos de adutos formados e os mecanismos de reparação mais conhecidos, com ênfase para os genes *PSO*.

O Capítulo I trata de uma revisão que abrange estudos recentes sobre a proteína Pso2 e suas homólogas em humanos, bem como sobre a caracterização de vias alternativas para a reparação de quebras duplas no DNA, que ampliam a compreensão da atuação da família Pso2 e de outras vias de reparação na manutenção da integridade genômica de *S. cerevisiae*. Este capítulo será submetido para publicação na revista *Fungal Genetics and Biology*.

O Capítulo II descreve o isolamento pelo sistema dois-híbridos em levedura de proteínas que interagem com Pso2p, entre as quais a cinase Sak1 despertou especial interesse, sendo selecionada para uma caracterização mais detalhada. Este capítulo foi submetido para publicação na revista *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, e encontra-se na fase de análise pelos revisores da revista.

Os resultados complementares, que auxiliaram na elaboração do modelo de atuação da proteína Pso2 na reparação de quebras duplas no DNA associadas a ICLs, são apresentados no Capítulo III.

Na sequência, apresenta-se uma discussão geral inter-relacionando os resultados descritos nos capítulos acima, as conclusões e as perspectivas geradas por esta tese.

Esta tese foi redigida conforme as novas regras do Acordo Ortográfico instituído pelo Decreto nº 6.583, de 29 de setembro de 2008.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS _____	12
RESUMO _____	15
ABSTRACT _____	16
INTRODUÇÃO _____	17
1 Introdução geral _____	18
2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo experimental para estudo da reparação do DNA _____	20
2.1 Grupos de epistasia genética para os genes de reparação do DNA em leveduras _____	22
3 Agentes indutores de pontes intercadeia no DNA _____	23
3.1 Mostardas nitrogenadas _____	26
3.2 Psoralenos _____	27
3.3 Cisplatina _____	29
4 Reparação de pontes intercadeias no DNA em <i>S. cerevisiae</i> _____	30
4.1 Reparação por excisão de nucleotídeos (NER) _____	31
4.2 Reparação por recombinação homóloga (HR) e não homóloga (NHEJ) _____	32
4.2.1 O complexo MRX _____	36
4.3 Reparação por excisão de bases (BER) e reparação de bases mal- emparelhadas (MMR) _____	39
4.4 Síntese translesão (TLS) e reparação pós-replicativa (PRR) _____	40
4.5 Os genes <i>PSO</i> na reparação de pontes intercadeia no DNA (ICLs)_	43
4.5.1 O gene <i>PSO2</i> _____	43
4.6 A origem e a reparação de quebras-duplas (DSBs) associadas a ICLs _____	46

4.7 Reparação de estruturas do tipo <i>hairpin</i> _____	49
OBJETIVOS _____	51
1. Objetivo geral _____	52
1.1 Objetivos específicos _____	52
CAPÍTULO I _____	53
New features on Pso2 protein family in DNA interstrand cross-link repair and in the maintenance of genomic integrity in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> _____	54
CAPÍTULO II _____	76
Sak1 kinase contributes to Pso2 nuclease in repair of DNA damage induced by interstrand crosslink-inducing agents in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> _____	77
CAPÍTULO III _____	112
Resultados complementares da Tese - Supplementary Results for Study of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>PSO2</i> gene interactions with DNA damage response genes after treatment with interstrand crosslink-inducing agents _____	113
DISCUSSÃO GERAL _____	122
CONCLUSÕES _____	132
1. Conclusão geral _____	133
1.1 Conclusões específicas _____	133
PERSPECTIVAS _____	135
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	137
<i>CURRICULUM VITAE</i> _____	151

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-CPS: 3-carbetoxipsoraleno

4-NQO: 4-Nitroquinolina 1-óxido

6-4PP: 6-4-pirimidina pirimidona

8-MOP: 8-metoxipsoraleno

β -CASP: domínio metalo- β -lactamase CPSF, Ártemis, Snm1, Pso2

ATLD: *Ataxia telangiectasia-like disorder*, doença semelhante à Ataxia Telangiectasia

ATM: Ataxia telangiectasia mutada

ATR: Ataxia telangiectasia mutada e relacionada à Rad3

BER: *Base Excision Repair*, Reparação por Excisão de Bases

CPD: dímeros de pirimidina ciclobutano

CDDP: *cis*-diaminodicloroplatina II (cisplatina)

DNA-PK: Proteína cinase dependente de DNA

DNA-PKcs: Subunidade catalítica da proteína cinase dependente de DNA

DSBs: *Double-strand Breaks*, quebras de fita dupla de DNA

DTDF: Ditelureto de difenila

EMS: etilmetanosulfonato

FA: Anemia de Fanconi

FAP: formamido-pirimidina

GGR: *Global Genome Repair*, reparação global do genoma pelo NER

HN1: Bis(2-cloroetil)etilamina (mostrada nitrogenada monofuncional)

HN2: Mecloretamina (mostrada nitrogenada bifuncional)

HR: *Homologous Recombination*, Reparação por Recombinação Homóloga

ICLs: *Interstrand DNA crosslinks*, Pontes intercadeias do DNA

IR: Radiação ionizante

MBL: *Metallo-β-lactamase domain*, domínio metalo-β-lactamase

MDA: malonaldeído

MMEJ: *Microhomologous end-joining*, Reparação por micro-homologia

MMS: metil-metano-sulfonato

MMR: *Mismatch repair*, Reparação de bases mal-emparelhadas

MRN: complexo MRE11/RAD50/NBS1

MRX: complexo Mre11p/Rad52p/Xrs2p

NBS: *Nijmegen breakage syndrome*, Síndrome de quebra de Nijmegen

NER: *Nucleotide excision repair*, Reparação por Excisão de Nucleotídeos

NHEJ: *Non-homologous end joining*, Reparação por Recombinação Não Homóloga

Pol α : DNA polimerase alfa

Pol β : DNA polimerase beta

Pol δ : DNA polimerase delta

Pol η : DNA polimerase eta

Pol ζ : DNA polimerase zeta

PRR: *Post-replication repair*, Reparação pós-replicacional

PUVA terapia: psoraleno + UVA

SDSA: *Synthesis Dependent Strand Annealing*, anelamento de cadeias dependente de síntese

Sítios AP: sítiosapurínicos/apirimídicos

SSA: *Single-strand Annealing*, anelamento de cadeias simples

SSB: *Single-strand Breaks*, quebras de fita simples

ssDNA: *Single-stranded DNA*, DNA de fita simples

TCR: *Transcription Coupled Repair*, Reparação associada à transcrição pela via NER

TLS: *Translesion Synthesis*, Reparação por Síntese Translesão

UV: Luz ultra-violeta

UVA: luz ultra-violeta de ondas longas (320 – 400 nm)

UVC: luz ultra-violeta de ondas curtas (100 – 280 nm)

V(D)J: *Variable diversity joining*, Recombinação que produz diversidade nos linfócitos

WT: *wild type*, linhagem selvagem

XP: *Xeroderma pigmentosum*

RESUMO

O DNA sofre constantes ataques de agentes que podem causar danos estruturais em uma ou em ambas as cadeias. Os agentes mutagênicos bifuncionais, amplamente utilizados como quimioterápicos, produzem uma lesão do tipo ponte intercadeia (ICL), que consiste numa ligação covalente entre as duas cadeias do DNA. As ICLs causam o bloqueio da replicação e da transcrição do DNA, e sua resolução pode levar à formação de quebras-duplas (DSBs). A célula utiliza vários mecanismos para reparar ICLs, entre os quais está a proteína Pso2, cuja transcrição é ativada especificamente após a indução desta lesão na célula. Visando à melhor caracterização da função da Pso2p na reparação de ICLs, buscou-se neste trabalho a identificação de proteínas interativas com Pso2p, através do sistema dois-híbridos em levedura. Entre as proteínas de fusão isoladas, a cinase Sak1 despertou grande interesse. Verificou-se que Sak1p interage com o domínio C-terminal β -CASP de Pso2p, além de fosforilar Pso2p *in vitro*. Ainda, Pso2p e Sak1p apresentaram interação epistática após tratamento com agentes indutores de ICLs. A partir desses resultados, investigou-se a interação dos genes que codificam para estas proteínas com outros genes da resposta a danos no DNA. Verificou-se que *YKU70* não interage geneticamente com *PSO2* após tratamento com 8-metoxipsoraleno fotoativado (8-MOP+UVA) e mostarda nitrogenada (HN2). As interações observadas após tratamento com 8-MOP+UVA para os genes do complexo MRX indicam que Mre11p (produto do gene *MRE11*) compete pelo mesmo substrato com as proteínas Pso2 e Sak1, mas atuam em vias diferentes de reparação de ICLs. Para o gene *RAD50*, constatou-se interação epistática com *PSO2* e *SAK1*, apontando para a participação das proteínas Rad50, Pso2 e Sak1 na mesma via de reparação de ICLs. O gene *XRS2*, por sua vez, interagiu de forma não epistática com *SAK1*, indicando que as respectivas proteínas atuam em vias e substratos diferentes durante a reparação de ICLs. Por outro lado, constatou-se que não há interação genética de *TEL1* e *TOR1* com o gene *PSO2* após tratamento com 8-MOP+UVA, sugerindo que as cinases Tel1 e Tor1 não participam da sinalização para a reparação de ICLs na via que inclui Pso2p. Com estes resultados, nós mostramos que a cinase Sak1 é importante para a atuação da nuclease Pso2 na reparação de quebras duplas no DNA. Conforme o modelo proposto neste trabalho, esta interação possivelmente seja necessária para ativar a função endonucleásica da proteína Pso2, recentemente identificada, para permitir a abertura de estruturas do tipo *hairpin* (grampo), que se formam no DNA em consequência de ICLs.

ABSTRACT

DNA is often threatened by agents that may cause structural damage on one or both strands. Bifunctional mutagenic agents that are largely used as chemotherapeutics, produce a serious damage, namely interstrand crosslink (ICL), that covalently link both DNA strands. The formation of ICLs blocks DNA replication and transcription, and their processing may cause double strand-breaks (DSBs). Cells utilize many mechanisms to repair ICLs, including the Pso2 protein, which transcription is induced specifically after the formation of this lesion in DNA. In this study, we aimed to extend the characterization of Pso2 function in ICL repair through the identification of interacting proteins, using the two-hybrid system (THS) in yeast. In addition, the genetic interaction of *PSO2* with genes involved in early stages of ICL repair was also investigated. Among the fusion proteins isolated by THS, Sak1 kinase has raised great interest for further investigation. The results showed that Sak1p interacts with the C-terminal β -CASP domain of Pso2p and is able to phosphorylate Pso2p *in vitro*. Pso2p and Sak1p showed epistatic interaction after treatment with ICL-inducing agents. Based on these results, we investigated the interaction of *PSO2* and *SAK1* genes with other genes involved in DNA DSB repair. We found that *YKU70* does not interact with *PSO2* after treatments with photoactivated (8-methoxypsoralen) 8-MOP+UVA and nitrogen mustard (HN2). The interactions observed for MRX genes after treatment with 8-MOP+UVA indicate that Mre11p (product of *MRE11* gene) competes with Pso2p and Sak1p for the same substrate, but act in different ICL repair pathways. *XRS2* gene, in turn, showed an additive interaction with *SAK1* indicating that the respective proteins act in different substrates and pathways during ICL repair. On the other hand, *RAD50* presents epistatic interaction with *PSO2* and *SAK1* genes, pointing to the participation of Rad50, Pso2 and Sak1 proteins in the same pathway for ICL repair, in exponentially growing *S. cerevisiae* cells. Regarding to the *TEL1* and *TOR1* genes, it was found no genetic interaction with *PSO2* gene after exposure to 8-MOP+UVA, suggesting that Tel1 and Tor1 kinases do not participate in signaling for ICL repair in the pathway which Pso2 nuclease acts. Considering these results, we showed that Sak1 kinase plays an important role in contribution to Pso2 nuclease in the repair of ICL-induced DSBs. According to the proposed model in this work, this interaction is possibly necessary to activate Pso2 endonucleolytic activity, recently identified to the opening of hairpin structures, which are formed as a result of the DNA ICLs.

Introdução

1. Introdução geral

O DNA genômico está constantemente suscetível a modificações químicas quando exposto a certos agentes ambientais, quimioterápicos ou agentes endógenos gerados nos processos celulares (SCHÄRER, 2005; VASQUEZ & LEGERSKI, 2010). Os danos produzidos por estas reações químicas podem levar a mutações e à morte celular (RUPNIK *et al.*, 2010). Muitas destas lesões, como modificações de bases ou nos grupos fosfato, ocorrem em apenas uma das cadeias do DNA. No entanto, certos agentes - como os agentes alquilantes bifuncionais, compostos de platina e psoraleno - podem produzir adutos covalentes entre bases do DNA situadas em cadeias opostas, levando à formação de pontes intercadeia no DNA (ICL – do inglês *interstrand crosslink*) (NOLL *et al.*, 2006). As ICLs consistem numa das lesões mais genotóxicas para a célula por impedirem a replicação e a transcrição do material genético (BRENDEL & HENRIQUES, 2001; VASQUEZ, 2010). Além disso, a resolução de ICLs pela célula pode levar à formação de quebras duplas na cadeia do DNA (*double strand breaks*, DSBs), conforme evidenciado pela primeira vez por MAGAÑA-SCHWENCKE *et al.* (1982), que causam a interrupção da informação genética. É justamente esse efeito citotóxico que constitui a base de ação de muitas das drogas anticâncer em uso atualmente (MCHUGH *et al.*, 2001; NOLL *et al.*, 2006).

A fim de proteger a informação genética, as células desenvolveram uma sofisticada rede de proteínas que monitoram constantemente a integridade genômica. Esta rede, chamada de ‘resposta ao dano no DNA’ (Figura 1), detecta e sinaliza a presença de lesões, a fim de coordenar o metabolismo do DNA com a progressão do ciclo celular, desencadeando várias respostas biológicas que incluem a replicação e a reparação do DNA, paradas temporárias no ciclo celular (pontos de checagem) e apoptose (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2010; RUPNIK *et al.*, 2010).

Os mecanismos de reparação do DNA são bem compreendidos em *Saccharomyces cerevisiae* e, na sua maioria, são compartilhados pelos organismos superiores, incluindo os seres humanos (DRONKERT & KANAAR, 2001; MCHUGH *et al.*, 2001; CATTELL *et al.*, 2010; MCVEY, 2010). Entretanto, como as ICLs constituem um tipo de lesão muito complexa, que atinge ambas as cadeias do DNA, sua reparação envolve vários mecanismos, tornando seu estudo uma tarefa desafiadora (MCHUGH *et al.*, 2001; HO & SCHÄRER, 2010). Proteínas de vários dos principais mecanismos de reparação do DNA

contribuem para a reparação das ICLs nas células (LEGERSKI, 2010; MACÉ-AIMÉ *et al.*, 2010; SHEN & LI, 2010; VASQUEZ, 2010; WOOD, 2010). Entre elas, a proteína Pso2, identificada inicialmente em *S. cerevisiae*, despertou especial interesse por estar envolvida especificamente na reparação de danos induzidos por agentes bifuncionais (HENRIQUES & MOUSTACCHI, 1980; RUHLAND *et al.*, 1981; HENRIQUES *et al.*, 1997; BARBER *et al.*, 2005). Porém, mesmo com os avanços ocorridos nos últimos anos, ainda não se chegou a uma visão completa das relações entre os diferentes processos que envolvem a reparação de uma ICL. Além disso, alguns componentes das vias de reparação permanecem incógnitos e novas funções de moléculas conhecidas continuam a ser descobertas (PAN *et al.*, 2006; BANDYOPADHYAY *et al.*, 2010).

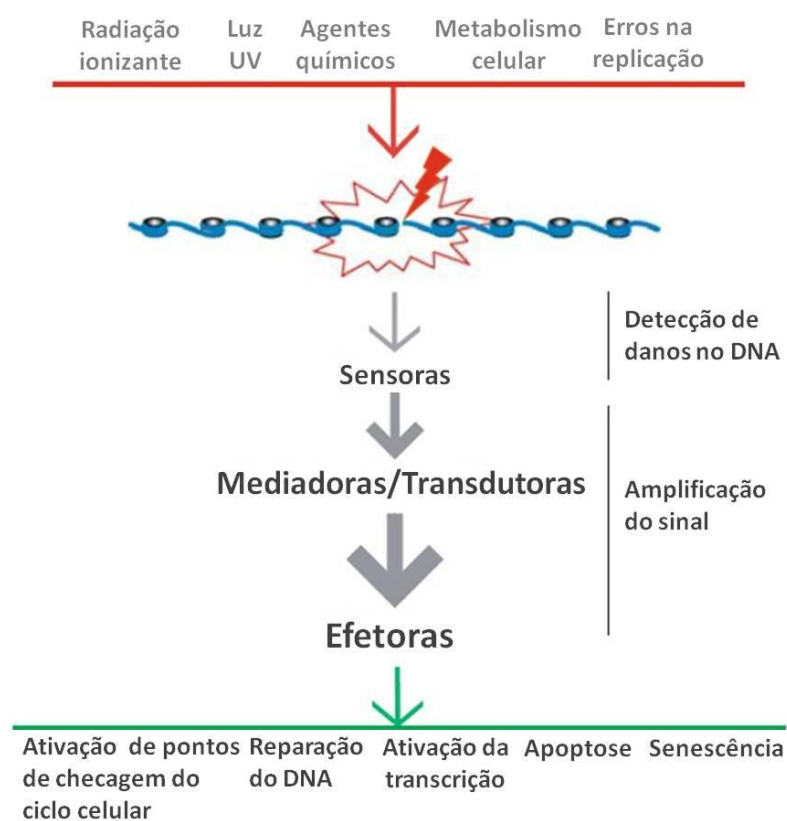


Figura 1. Resposta a danos no DNA. Danos no DNA causados por agentes endógenos e exógenos são reconhecidos por proteínas sensoras, que ativam a cascata de sinalização. O sinal é amplificado por mediadoras/transdutoras, chegando às proteínas efetoras, que desencadeiam as respostas celulares aos danos no DNA. Adaptada de RUPNIK *et al.*, 2010.

Níveis significativos de resistência aos agentes utilizados na terapia contra o câncer são encontrados em células tumorais, que surgem em grande parte devido a alterações ou aumento na regulação das vias de reparação do DNA que removem ICLs (MCHUGH *et al.*, 2001; HO & SCHÄRER, 2010; VASQUEZ & LEGERSKI, 2010). Assim, o estudo das vias envolvidas na reparação de ICLs é de grande interesse, podendo levar ao desenvolvimento de protocolos de tratamento mais eficazes contra o câncer e outras doenças genéticas causadas por defeitos na reparação do DNA (NOLL *et al.*, 2006; MATUO *et al.*, 2012; MORAES *et al.*, 2012).

2. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental para estudo da reparação do DNA

A levedura *S. cerevisiae* foi o primeiro eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado (GOFFEAU *et al.*, 1996), o que permitiu um grande desenvolvimento nos estudos que utilizam este organismo como modelo. *S. cerevisiae* tem sido utilizada com sucesso como modelo para estudos do controle do ciclo celular, da reparação do DNA, do envelhecimento, da expressão gênica e das vias celulares e moleculares de doenças humanas, incluindo o câncer (KURTZ *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2008; KARATHIA *et al.*, 2011). Aproximadamente 30% dos genes envolvidos em doenças humanas possuem homólogos funcionais em levedura (BOTSTEIN & FINK, 2011; KARATHIA *et al.*, 2011). Atualmente, o *Saccharomyces Genome Database* (SGD; <http://www.yeastgenome.org/>) fornece informações sobre cada gene deste organismo.

A conservação de genes e sistemas durante a evolução permite que doenças genéticas humanas associadas com a reparação do DNA possam ser investigadas diretamente em leveduras (RESNICK & COX, 2000). Outras vantagens apresentadas para o uso de *S. cerevisiae* como organismo modelo são o genoma pequeno (aproximadamente 200 vezes menor que o humano), a multiplicação rápida (cerca de 2 horas), a facilidade de manipulação, o baixo custo de cultivo e a possibilidade de monitorar a progressão do ciclo celular pela morfologia da célula e do núcleo (HENRIQUES *et al.*, 1997; BARR, 2003; BOTSTEIN & FINK, 2011). Além disso, as leveduras apresentam estágio haplóide e diploide durante o ciclo de vida, permitindo a investigação de mutações recessivas que podem ser ‘mascaradas’ pelo alelo selvagem no estado diploide (PEREGO *et al.*, 2000).

Entre os benefícios apresentados pela levedura *S. cerevisiae*, a facilidade da combinação de mutações foi uma das principais razões que despertou otimismo entre os pesquisadores para seu uso como organismo modelo no final da década de 1980 (BOTSTEIN & FINK, 1988), sendo que vários estudos genéticos e bioquímicos em *S. cerevisiae* contribuíram significativamente para o conhecimento dos mecanismos de reparação do DNA em eucariotos (NOLL *et al.*, 2006; RESNICK & COX, 2000; BOTSTEIN & FINK, 2011). De fato, a baixa complexidade das células de levedura em comparação às células tumorais, e a possibilidade de estudar o efeito da alteração de um único gene são características que tornam este organismo uma importante ferramenta para a pesquisa do câncer (PEREGO *et al.*, 2000; KURTZ *et al.*, 2004; MATUO *et al.*, 2012).

Adicionalmente, a expressão heteróloga de genes humanos em levedura é de grande utilidade para a avaliação da função de proteínas associadas a doenças, além de fornecer pistas sobre os mecanismos de progressão das mesmas (BOTSTEIN & FINK, 2011; PEREIRA *et al.*, 2012). Embora muitas vezes estudos envolvendo a expressão de proteínas heterólogas em leveduras sejam vistos com ceticismo devido aos níveis de expressão não fisiológicos (PEREIRA *et al.*, 2012), a reconhecida contribuição destes eucariotos unicelulares para o atual conhecimento de aspectos fundamentais da biologia celular de eucariotos superiores justifica sua exploração como modelo de sistema celular (MATUO *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012). Como exemplo, pode-se citar o estudo de Fishel *et al.* (FISHEL *et al.*, 1993), que relata a descoberta de que o câncer de cólon não poliposo hereditário está associado a defeitos na reparação de bases mal emparelhadas do DNA, sendo causado por mutações nos ortólogos humanos dos genes *MSH2* e *MLH1* de *S. cerevisiae*.

Os mecanismos de regulação dos genes de checagem do ciclo celular - que determinam a transição entre as fases G1/S e G2/M – também são muito similares entre leveduras e humanos. A única divergência significativa neste mecanismo é a ausência da proteína p53 em leveduras, um ponto central na regulação do ciclo celular e da apoptose em mamíferos. Mesmo assim, as leveduras foram úteis para o entendimento das funções deste gene humano, visto que a expressão heteróloga do gene p53 (normal e mutante) pode ser monitorada facilmente em leveduras (MOKDAD-GARGOURI *et al.*, 2001). Estes fatores, associados à dificuldade frequentemente encontrada para realizar as manipulações genéticas necessárias para a determinação da função de um gene em células humanas, tem

levado ao ‘re-surgimento’ das leveduras como ferramenta valiosa para o estudo da função de genes humanos (MAGER & WINDERICKX, 2005; PEREIRA *et al.*, 2012).

2.1 Grupos de epistasia genética para os genes de reparação do DNA em leveduras

A levedura *S. cerevisiae* possui mais de 50 genes envolvidos na reparação de lesões no DNA (FRIEDBERG *et al.*, 1996). O estudo dos mecanismos de reparação do DNA em leveduras iniciou com o isolamento de uma série de mutantes sensíveis a diferentes agentes físicos (radiações ionizantes, luz ultravioleta) e químicos (metil-metano-sulfonato, mostardas nitrogenadas, psoralenos) (GAME & COX, 1971; LEMONTT, 1971; RODARTE-RAMON & MORTIMER, 1972; GAME & MORTIMER, 1974; PRAKASH & PRAKASH, 1977; HENRIQUES & MOUSTACCHI, 1980). A partir destes estudos, seguiu-se com a investigação das interações genéticas, que são definidas de acordo com a resposta de linhagens mutantes após exposição a um determinado agente genotóxico (Figura 2). Assim, estes mutantes foram agrupados de acordo com a sensibilidade a diferentes tipos de danos no DNA, originando os três grupos principais de epistasia, que representam diferentes mecanismos de reparação do DNA: via RAD3 - reparação por excisão de nucleotídeos, via RAD52 - reparação por recombinação e via RAD6 - reparação pós-replicativa e/ou mutagênica (GAME & COX, 1971; BRENDEL & HAYNES, 1973; GAME & MORTIMER, 1974; FRIEDBERG *et al.*, 2006).

Estes grupos de epistasia não são completamente independentes; ao contrário, ocorrem várias sobreposições dos mecanismos, demonstradas pela presença de alguns genes em mais de um desses grupos (HENRIQUES & BRENDEL, 1990; HENRIQUES *et al.* 1997; FRIEDBERG *et al.*, 2006). A reparação de ICLs em *S. cerevisiae*, assim como em outros eucariotos, utiliza proteínas dos três principais grupos descritos acima, além de proteínas identificadas em estudos posteriores (LEHOCZKÝ *et al.*, 2007).

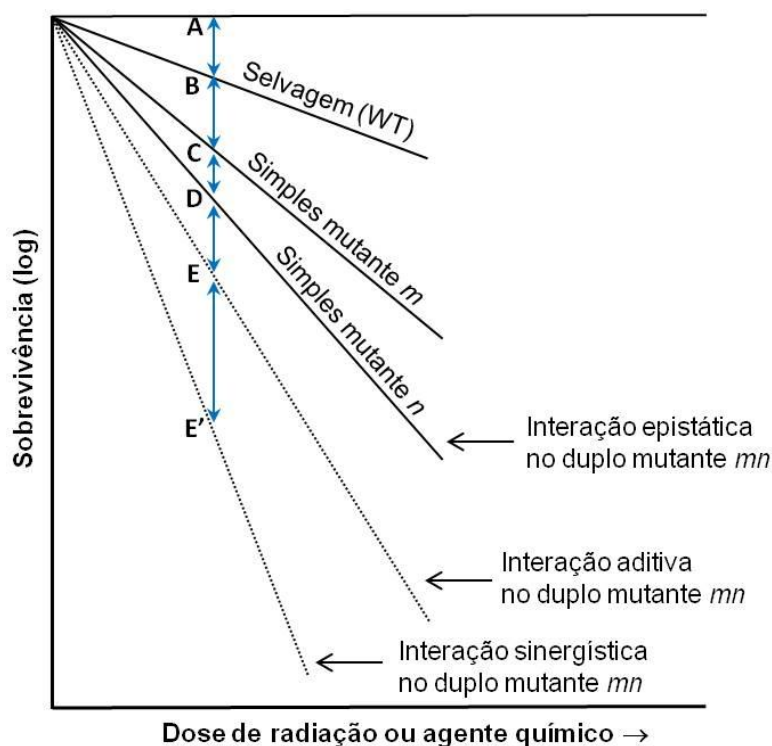


Figura 2. Representação gráfica dos três tipos de interações genéticas possíveis em linhagens duplo-mutantes em genes envolvidos nos processos de reparação do DNA. Interação epistática: o duplo mutante *mn* deve apresentar sensibilidade semelhante ao simples mutante mais sensível *n*. Interação não epistática: a interação dos dois genes aumenta a sensibilidade do duplo mutante *mn* de forma a torná-lo mais sensível que o simples mutante *n*, podendo resultar em interação aditiva (onde $AE = AC + BD$) ou em interação sinérgica (onde $AE' > AE$). Adaptada de BRENDEL & HAYNES, 1973.

3. Agentes indutores de pontes intercadeias no DNA

A formação de ligações covalentes entre determinadas classes de substâncias químicas e as bases nitrogenadas do DNA gera estruturas denominadas 'adutos'. Os compostos químicos ou agentes formadores de adutos podem ser separados em dois grandes grupos: (i) agentes monofuncionais, quando induzem a formação de ligação covalente entre um composto químico e apenas uma base nitrogenada, formando um aduto monofuncional e (ii) agentes bi- ou polifuncionais, quando a substância química liga-se covalentemente a duas bases nitrogenadas, formando adutos bifuncionais. Estes, por sua vez, podem ser formados entre bases situadas na mesma cadeia (ponte intracadeia -

intrastrand crosslinks, IaCL) ou em cadeias opostas do DNA (ponte intercadeia - *interstrand crosslinks*, ICLs) (SCHÄRER, 2005).

Entre as várias classes de compostos químicos monofuncionais, destacam-se os agentes alquilantes, que se ligam às bases nitrogenadas do DNA por meio de grupos metila ou etila. Vários compostos deste grupo possuem finalidades terapêuticas, especialmente para o tratamento de tumores (e.g., metil-metano-sulfonato, etil-metano-sulfonato, nitrossuréia). Por outro lado, os agentes bi- e polifuncionais podem causar tanto a formação de adutos monofuncionais quanto bifuncionais (IaCLs e ICLs), além de ligações cruzadas entre DNA e proteínas (DRONKERT & KANAAR, 2001; LEHOCZKÝ *et al.*, 2007).

Muitos agentes bifuncionais possuem aplicações diretas na terapia clínica para tratamento de tumores e patologias da pele (DRONKERT & KANAAR, 2001). Dentre os compostos bifuncionais com importância médica estão os agentes alquilantes bifuncionais mostarda nitrogenada, derivados da nitrossuréia e mitomicina C; os compostos platinados como a cisplatina e seus análogos di- e trinucleares, e o psoraleno e seus derivados (Figura 3), que induzem a formação de ICLs em diferentes porcentagens (NOLL *et al.*, 2006).

As restrições físicas impostas pelas ligações cruzadas à dupla hélice do DNA faz com que os agentes indutores de ICLs sejam altamente deletérios. De fato, uma análise comparativa realizada entre 234 compostos químicos classificou os agentes indutores de ICLs entre os 20 compostos mais genotóxicos (LOHMAN 1999). Esta natureza genotóxica é refletida na capacidade destes agentes em causar eventos mutagênicos, capazes de levar à formação de tumores (NOLL *et al.*, 2006). Enquanto os agentes alquilantes monofuncionais produzem, na maior parte, mutações pontuais, os agentes bifuncionais são tipicamente clastogênicos, causando alterações cromossômicas resultantes de quebras nas cadeias do DNA e da hiper-recombinação (WIJEN *et al.*, 2000).

As ICLs também podem ser causadas no DNA a partir de agentes resultantes do metabolismo celular (Figura 4). Entre os principais agentes endógenos indutores de ICLs estão os eletrófilos bifuncionais, como o malonaldeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica (NIEDERNHOFER *et al.*, 2003). Adutos similares também são formados a partir de aldeídos insaturados de origem ambiental, como acroleína e crotonaldeído, bem como a partir das reações de condensação do DNA com formaldeído ou acetaldeído (SCHÄRER,

2005; BRENDDEL *et al.*, 2010). Outro agente de origem endógena que produz ICLs é o óxido nítrico, que reage com o nitrogênio N2 da guanina na sequência CpG (CAULFIELD *et al.*, 2003).

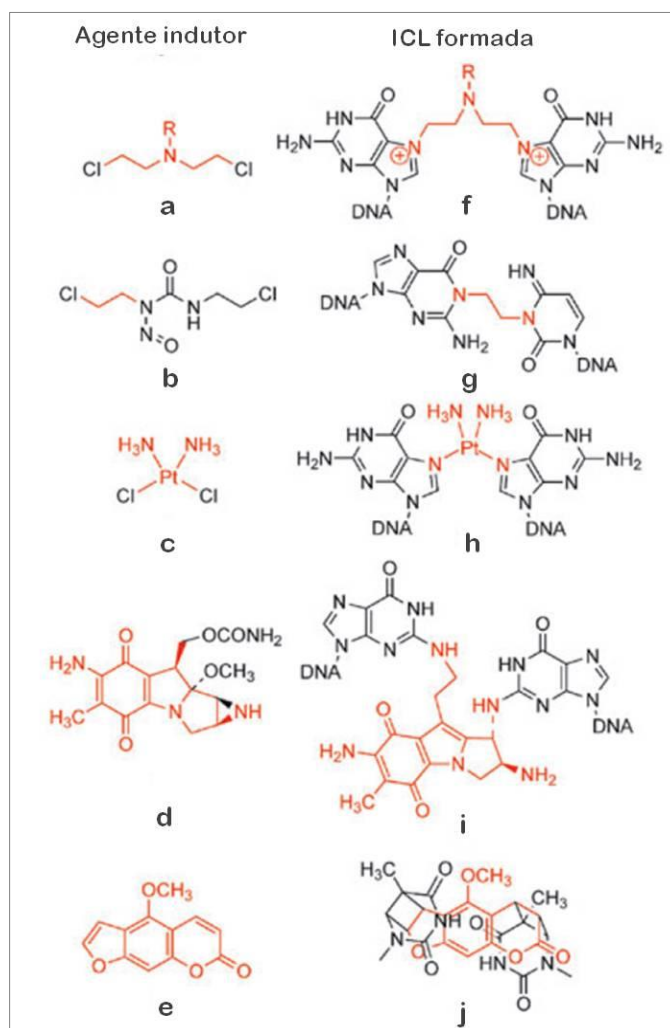


Figura 3. Exemplos de pontes intercadeia no DNA formadas por agentes utilizados em terapias contra o câncer. (a) Clorambucil ($R = C_4H_6-C_2H_4-CO_2H$, mostarda nitrogenada); (b) Carmustina (nitrossuréia); (c) Cisplatina; (d) Mitomicina C; (e) Psoraleno. As partes do agente indutor de ICL que são transferidas para o DNA, bem como os resíduos modificados nas bases do DNA, são mostradas em vermelho (f, g, h, i, j). Adaptada de SCHÄRER, 2005.

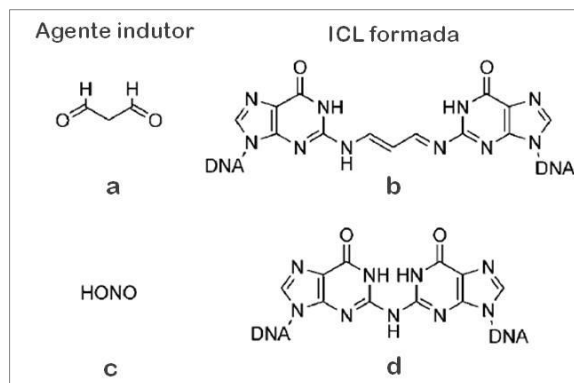


Figura 4. Exemplos de pontes intercadeia no DNA formadas por agentes endógenos. O malonaldeído (a) pode reagir com aminas exocíclicas em resíduos de guanina, formando uma ICL (b). O ácido nitroso (c), a forma hidratada do óxido nítrico, pode formar ICLs entre guaninas adjacentes em fitas opostas (d). Adaptada de SCHÄRER, 2005.

A seguir, são descritas as principais características bioquímicas e o impacto da estrutura química da ICL formada no DNA, dos agentes bifuncionais utilizados nos experimentos que compõem esta tese.

3.1 Mostradas nitrogenadas

O uso de agentes citotóxicos para quimioterapia teve sua origem a partir do gás mostarda, que foi desenvolvido com a finalidade de guerra química durante a Primeira Guerra Mundial. Em 1942, a mostarda nitrogenada mecloretamina (HN2, a mais utilizada em experimentos) foi utilizada com sucesso para induzir remissão tumoral transitória em um paciente com linfoma, acontecimento que marcou o início da era moderna de quimioterapia do câncer (ALMEIDA *et al.*, 2005; VASQUEZ & LEGERSKI, 2010). Mostardas nitrogenadas com substituintes aromáticos (clorambucil, melfalan) (Figura 3a) ou grupos fosfamida bioativados (ciclofosfamida) ainda são usados com frequência em tratamentos clínicos contra mielomas, linfomas, leucemia, câncer de ovário, entre outros tumores (LEHOCZKÝ *et al.*, 2007). Há evidências de que a resistência a mostardas nitrogenadas em algumas células tumorais de mamíferos pode ser consequência do

aumento na reparação por recombinação homóloga e não homóloga (PANASCI *et al.*, 2001).

O composto HN2 forma principalmente monoadutos (90%), enquanto que a quantidade de ICLs formadas é de 1% a 5%, ocorrendo preferencialmente na sequência 5'-GNC-3'. Mesmo ocorrendo em pequena proporção, estudos demonstraram claramente que as ICLs (Figura 3f e 6c) constituem a lesão crítica para a citotoxicidade de HN2 nas leveduras *S. cerevisiae* e *S. pombe* (CHANEY & SANCAR, 1996; MCHUGH *et al.*, 1999; LAMBERT *et al.*, 2003). As ICLs induzidas por mostardas nitrogenadas são propensas a altas taxas de perdas espontâneas devido à instabilidade da ligação N9-glicosídica das guaninas alquiladas em N7, as quais geram um sítio apurínico que converte a ICL em monoaduto (HENRIQUES *et al.* 1997; BRENDDEL *et al.* 2010). Alternativamente, o anel imidazol da guanina alquilada pode sofrer hidrólise e produzir o derivado formamido-pirimidina (FAP), que é resistente a reações químicas adicionais. Neste caso, a ICL teria sua estrutura modificada (NOLL *et al.*, 2006).

3.2 Psoralenos

Os psoralenos são compostos da classe das furocumarinas, que consistem de metabólitos secundários isolados de plantas. Os antigos egípcios já utilizavam extratos de plantas contendo estes compostos com fins medicinais, para tratar doenças da pele (NOLL *et al.*, 2006). Vários psoralenos sintéticos estão disponíveis atualmente para o uso clínico na foto-quimioterapia contra doenças inflamatórias da pele como psoríase, vitiligo e eczemas (ENGIN & OGUZ, 2005). Entre eles, destaca-se o 8-metoxipsoraleno (8-MOP) fotoativado com UVA (terapia PUVA), utilizado também para o tratamento de linfomas cutâneos das células-T (MORISON, 2004).

Estes compostos interagem com o DNA via intercalação, mas dependem de irradiação com UVA para formar adutos covalentes com o DNA (NOLL *et al.*, 2006). O modo como os psoralenos, em especial o 8-MOP, formam ICLs com o DNA é bastante conhecido (Figura 5). Inicialmente, o 8-MOP intercala-se entre as bases pirimídicas (com alta afinidade por timinas) e, após irradiação com UVA (365 nm), os adutos são formados por uma reação denominada fotoadição, que pode levar à formação de monoadutos ou ICLs (BETHEA *et al.*, 1999).

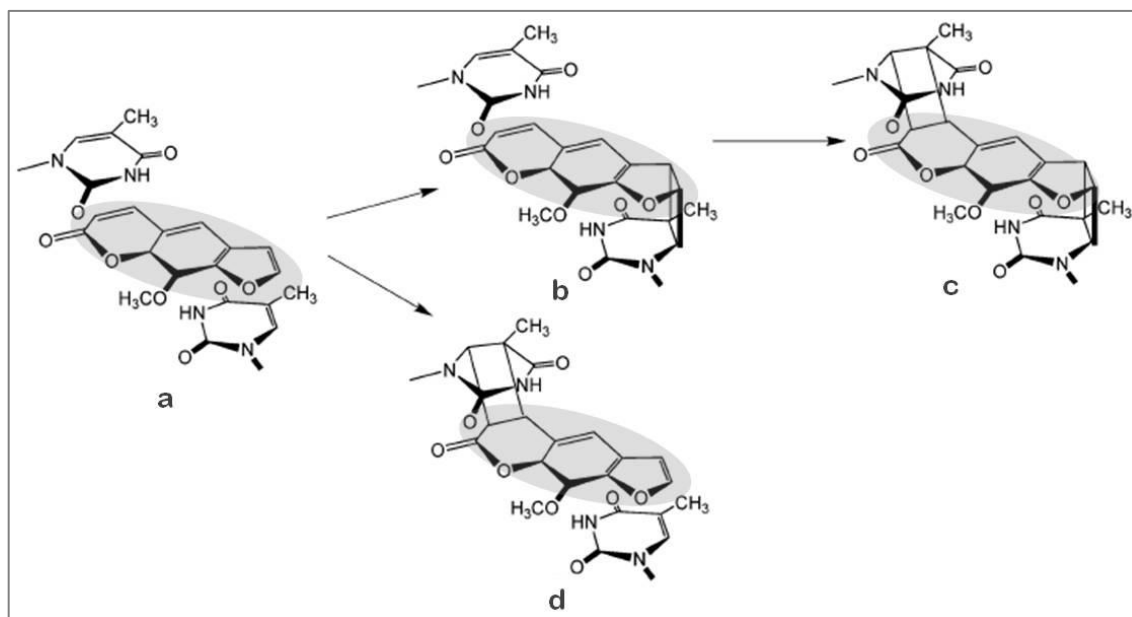


Figura 5. Fotoadutos causados pelo 8-metoxipsoraleno. Após intercalar-se entre duas timinas (a), as ligações duplas dos anéis 3,4-pirona e 4',5'-furano do 8-MOP (indicado com sombreamento cinza) são orientadas diretamente acima ou abaixo das ligações duplas 5,6 da timina. A absorção de luz UVA pelo 8-MOP desencadeia uma reação de cicloadição. (b) No caso de a primeira cicloadição ocorrer entre o anel furano e a timina adjacente, a conformação do composto permite a absorção de um segundo quantum de luz, levando à ligação da pirona com a timina da fita oposta, formando uma ponte intercadeia no DNA (c). Alternativamente, a primeira cicloadição pode ocorrer entre o anel pirona e a timina adjacente, causando a formação de um monoaduto (d), que possui impedimento conformacional para cicloadições posteriores. Adaptada de NOLL *et al.*, 2006.

Os psoralenos (principalmente o 8-MOP) são utilizados em muitos estudos sobre a reparação de ICLs em leveduras. Cerca de 40% dos monoadutos formados por 8-MOP fotoativado são convertidos em ICLs, que estão entre os mais estáveis biadutos formados no DNA, além de causar uma considerável distorção no sítio da lesão (Figura 6a) (HENRIQUES *et al.*, 1997; NOLL *et al.*, 2006; DARDALHON *et al.*, 2007). As ICLs induzidas por psoralenos podem causar bloqueio da transcrição e da replicação do DNA (VASQUEZ *et al.*, 2010).

3.3 Cisplatina

A cisplatina (*cis*-diamino-dicloroplatina[II]; CDDP) é um agente antitumoral bifuncional amplamente utilizado nos últimos 30 anos para o tratamento de tumores de cabeça e pescoço (HADDAD *et al.*, 2003), do esôfago, do pulmão, do pâncreas, do cólon e do ovário (BOULIKAS & VOUGIOUKA, 2004), e particularmente para tumores de testículo, para o qual é um tratamento que possibilita a cura, quando combinada com bleomicina e etoposídeo (RABIK & DOLAN, 2007).

Os agentes platinados reagem com moléculas de água ao entrar na célula, tornando-se positivamente carregados e capazes de interagir com o DNA, o RNA e proteínas (RABIK & DOLAN, 2007). O principal foco de formação de adutos da molécula de platina ocorre com o nitrogênio N7 das purinas, principalmente com a guanina (FRIEDBERG *et al.*, 2006). Os principais produtos da reação da CDDP com o DNA são Ia-CLs, que representam mais de 90% dos adutos formados, ocorrendo entre os resíduos de guanina nas sequências 5'-GG-3', 5'-GNG-3', e entre a adenina e a guanina na sequência 5'-AG-3' (GROSSMANN *et al.*, 2000). As ICLs induzidas por CDDP são formadas entre guaninas na sequência 5'-GC-3', compreendendo de 2-5% dos adutos (KARTALOU & SAMSON, 2000). Os adutos N7-platina com guanina são resistentes às reações de depurinação (NOLL *et al.*, 2006).

As ICLs induzidas por CDDP provocam grandes distorções na estrutura do dúplice de DNA (Figura 6b,d,e), provocando a extrusão dos resíduos de citosina complementares aos adutos formados com as guaninas, criando substratos similares aos reconhecidos pelas proteínas da via de reparação de bases mal emparelhadas do DNA (LEHOCZKÝ *et al.*, 2007). Além disso, a dobra na molécula de DNA em direção ao sulco maior, provocada pela ICL, expõe a superfície do sulco menor, permitindo a ligação de diversas classes de proteínas (NOLL *et al.* 2006; VASQUEZ 2010).

A via de reparação por excisão de nucleotídeos é essencial para a remoção de adutos causados por CDDP, sendo que o aumento da regulação desta via está associado com a resistência de tumores a este tratamento (SIDDIK, 2003).

A formação de adutos de cisplatina na molécula de DNA pode ocasionar quebras, especialmente DSBs, durante o processo de replicação. Além disso, estas DSBs também podem surgir como consequência da atuação de proteínas de reparação do DNA, uma vez

que estas lesões envolvem interações complexas entre diferentes vias de reparação (MOURA *et al.*, 2010).

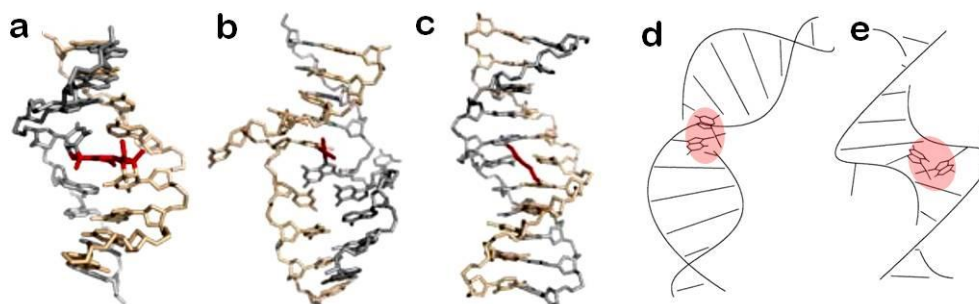


Figura 6. Estrutura de pontes intercadeia (ICL) no DNA e representação da distorção causada por cisplatina no DNA. (a) Psoraleno ligando duas timinas após intercalação. **(b)** Cisplatina ligando duas guaninas adjacentes, na fenda maior do DNA. **(c)** Mostarda nitrogenada ligando duas guaninas na posição 1,3, na fenda maior do DNA. Adaptada de HO & SCHARER, 2010. **(d)** Representação de uma ponte intracadeia (IaCL) entre duas guaninas, causada por cisplatina. **(e)** ICL entre duas guaninas, causada por cisplatina. A ICL induzida pela cisplatina gera uma grande distorção no dúplice de DNA, fazendo com que o B-DNA assumira a forma de Z-DNA. Adaptada de NATILE & COLUCCIA, 2001.

4. Reparação de pontes intercadeias no DNA em *S. cerevisiae*

As ICLs são formadas pela ligação covalente das cadeias opostas do DNA, representando uma lesão potencialmente letal para a célula porque bloqueiam a replicação e a transcrição. A reparação das ICLs apresenta um fator bastante peculiar, pois ambas as fitas do DNA estão envolvidas na lesão, que deve ser removida sem a perda da informação genética (LEHOCZKÝ *et al.*, 2007). A natureza química das ICLs é bastante variada, visto que podem ser causadas por agentes químicos exógenos e também por agentes ambientais e endógenos, o que motivou uma significativa seleção durante a evolução para o desenvolvimento de mecanismos que permitissem sua reparação ou tolerância pelas células (WOOD, 2010).

Em *S. cerevisiae*, a reparação de ICLs utiliza fatores dos três principais grupos de epistasia (RAD3, RAD6 e RAD52), além de genes identificados em estudos posteriores, pertencentes às vias de reparação por excisão de bases (*base excision repair*, BER), reparação de bases mal emparelhadas (*mismatch repair*, MMR) e à via similar a Anemia de Fanconi (*FA-like*) (SCHÄRER, 2005; LEHOCZKÝ *et al.*, 2007; LEGERSKI, 2010; SHEN & LI, 2010; VASQUEZ, 2010; MCHUGH *et al.*, 2012). Além destas, a reparação de ICLs também necessita proteínas que não fazem parte de nenhuma das vias de reparação, como a proteína Pso2 (HENRIQUES & MOUSTACCHI, 1980; RUHLAND *et al.*, 1981; HENRIQUES *et al.*, 1997; BARBER *et al.*, 2005). Nas seções seguintes, serão abordados aspectos das vias de reparação de ICLs, com enfoque principal para as proteínas de *S. cerevisiae*.

4.1 Reparação por excisão de nucleotídeos (NER)

A via de reparação NER (grupo de epistasia RAD3) é livre de erros e atua na remoção de lesões no DNA que causam grandes distorções na dupla hélice, como os fotoadutos induzidos pela radiação UVC (dímeros de pirimidina ciclobutano – CPD e 6-4-pirimidina pirimidona – 6-4PP) e as pontes intra- e inter cadeias no DNA (IaCLs e ICLs) (PRAKASH & PRAKASH, 2000).

Esta via caracteriza-se pela incisão da fita de DNA nas regiões 5' e 3' próximas à lesão, resultando na remoção de um fragmento de DNA de fita simples de 24 a 30 nucleotídeos contendo o dano. Em seguida, a DNA polimerase ressintetiza a cadeia utilizando a fita intacta como molde e a ligase sela as extremidades, restaurando a fita de DNA (PRAKASH & PRAKASH, 2000; NOLL *et al.*, 2006) (Figura 7). A via NER é subdividida em via de reparação acoplada à transcrição (*transcription coupled repair*, TCR) e via de reparação global do genoma (*global genome repair*, GGR). A TCR repara lesões presentes em fitas transcritas de genes expressos, enquanto a GGR atua no restante do genoma, sendo que ambas as vias diferem nas proteínas que reconhecem as lesões (PRAKASH & PRAKASH, 2000; SARASIN & STARY, 2007; PALOMERA-SANCHEZ & ZURITA, 2011).

O mecanismo básico de remoção do dano pela via NER é bastante conservado evolutivamente, sendo muito semelhante em *Escherichia coli*, leveduras e mamíferos

(ARAÚJO & WOOD, 1999; PRAKASH & PRAKASH, 2000; FRIEDBERG, 2003). Em humanos, defeitos na via NER resultam em doenças como Xeroderma Pigmentosum (XP), Síndrome de Cockayne e Tricotiodistrofia (PRAKASH & PRAKASH, 2000; WOOD, 2010).

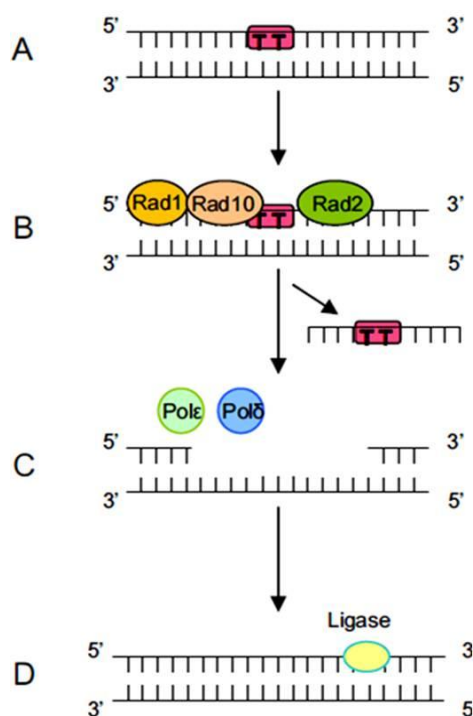


Figura 7. Esquema representativo da via de reparação por excisão de nucleotídeos (NER) em leveduras. (a) A lesão é reconhecida e o complexo de excisão, formado por Rad1-Rad10 e Rad2 (b), cliva as extremidades do oligonucleotídeo que contém o dano. (c) As DNA polimerases Polε e Polδ preenchem a lacuna, e a DNA ligase (d) sela as extremidades. Adaptada de SWANSON *et al.* (1999).

4.2 Reparação por recombinação homóloga (HR) e não homóloga (NHEJ)

A reparação por recombinação homóloga (grupo de epistasia RAD52) atua em quebras de cadeia simples, DSBs e ICLs no DNA, resgatando a informação genética de uma fita homóloga não danificada (cromossomo homólogo ou cromátide-irmã). Esta via é livre de erros e pode ocorrer nas fases S e G2 do ciclo celular (LISBY & ROTHSTEIN, 2009; MISTELI & SOUTOGLU, 2009). Vários processos diferentes de recombinação

geralmente são enquadrados na categoria de recombinação homóloga, incluindo o anelamento de cadeias simples (*single-strand annealing*, SSA), a reparação induzida por quebras (*break-induced repair*, BIR) e o anelamento de cadeias dependente de síntese (*synthesis dependent strand annealing*, SDSA) (Figura 8).

Na sua forma mais conhecida, a reparação por HR envolve 4 etapas: (i) reconhecimento e ligação do complexo MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) na extremidade da quebra, seguido de processamento nucleolítico, produzindo extremidades de fita simples 3' no DNA (ss-DNA), (ii) a fita-simples de DNA invade a cromátide homóloga mediada por proteínas, formando uma estrutura *D-loop*, (iii) ocorre síntese de DNA, regenerando assim a região danificada com a utilização da cromátide homóloga intacta como molde e (iv) resolução dos intermediários da junção de Holliday, que são clivados por uma resolvase, resultando em DNA dupla-fita com ou sem *crossover* (NOLL *et al.*, 2006; HINZ, 2010) (Figura 9a).

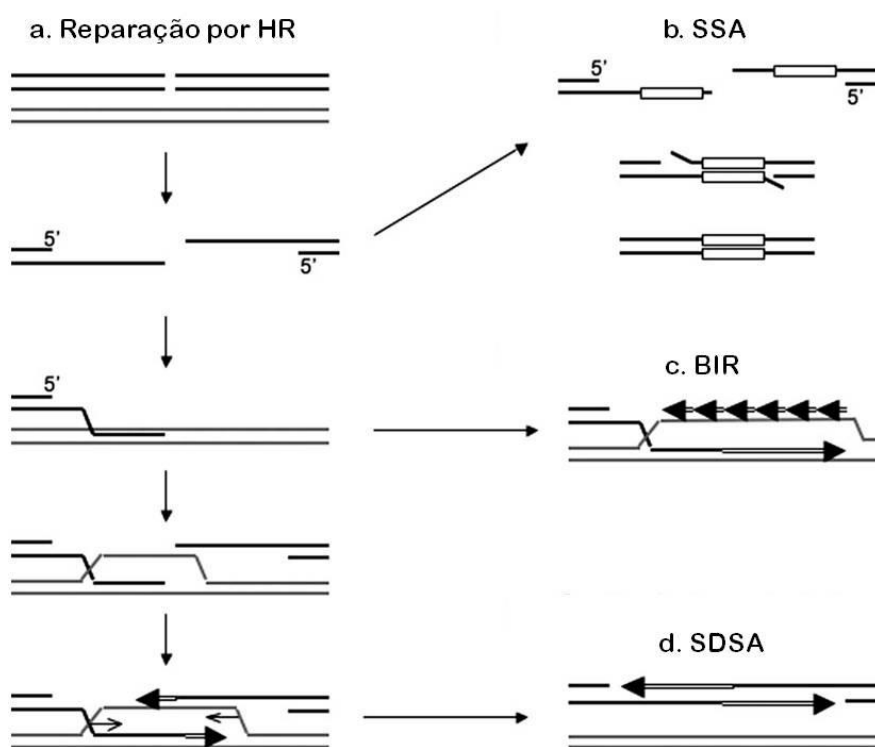


Figura 8. Mecanismos alternativos de reparação por recombinação homóloga.

(a) Formas alternativas de reparação de DSBs por homologia podem surgir a partir de diferentes estágios do processo de reparação por HR. (b) O anelamento de fita simples

(*single-strand annealing*, SSA) de sequências homólogas que flanqueiam a DSB pode ocorrer se as mesmas forem expostas pela resecção das extremidades do DNA, resolvendo a lesão com a deleção de sequências entre os dois sítios. (c) Pode ocorrer a formação de uma forquilha de replicação e a grande expansão da região do heterodúplex, levando a eventos de conversão gênica de longas regiões, chamado reparação induzida pela quebra (*break-induced replair*, BIR). (d) O processo predominante para a reparação por HR é o anelamento de cadeias dependente de síntese (*synthesis dependent strand annealing*, SDSA), que implica no relaxamento das estruturas de Holliday e re-anelamento das extremidades da quebra; após, a síntese de DNA provoca a invasão do dúplex original por uma das fitas. Adaptada de HINZ (2010).

Genes homólogos ao grupo RAD52 foram identificados em eucariotos, procariotos e *archaea*, indicando a alta conservação desta via (SYMINGTON, 2002). A descoberta de que várias síndromes humanas com propensão ao câncer, como a Síndrome de Quebra de Nijmegen e a Ataxia Telangiectasia, são causadas por defeitos na reparação de DSBs, destaca a importância desta via de reparação na manutenção da integridade genômica e na prevenção do câncer (CARNEY *et al.*, 1998; VARON *et al.*, 1998; STEWART *et al.*, 1999).

A via de reparação NHEJ processa DSBs pela ligação direta das extremidades, sem necessidade de homologia de sequência, levando à ocorrência de mutações (Figura 9b). Esta via de reparação ocorre preferencialmente na fase G1 do ciclo celular (LISBY & ROTHSTEIN, 2009). Em mamíferos, a presença de DSBs faz com que o heterodímero Ku (YKu70p-YKu80p em leveduras) ligue-se às extremidades do DNA, recrutando a subunidade catalítica da proteína cinase dependente de DNA (DNA-PKcs), que desencadeia mudanças na estrutura da cromatina em volta da lesão. No entanto, não existe homólogo para a DNA-PKcs em leveduras, o que sugere que o complexo MRX atue como fator que aproxima as extremidades da quebra (HEFFERIN & TOMKINSON, 2005). A reparação de DSBs em *S. cerevisiae* ocorre preferencialmente pela via HR nas fases S e G2; porém, quando esta se encontra inativa, a via NHEJ é recrutada (NOLL *et al.*, 2006).

A levedura *S. cerevisiae* não apresenta, entre os fatores do NHEJ, uma endonuclease para processar extremidades. Assim, a via NHEJ só atua com eficiência e

alta fidelidade na reparação de DSBs com extremidades compatíveis (MILNE *et al.*, 1996). Caso as extremidades da quebra sejam incompatíveis, ou não possuam grupos 3'-OH ou 5'-fosfato, é necessário um processamento das mesmas, que pode resultar em deleções ou inserções mutagênicas no sítio de reparação (SYMINGTON & GAUTIER, 2011). Vias alternativas de NHEJ têm sido identificadas, como a recombinação por micro-homologia (*microhomologous end joining*, MMEJ) (ver Capítulo 1).

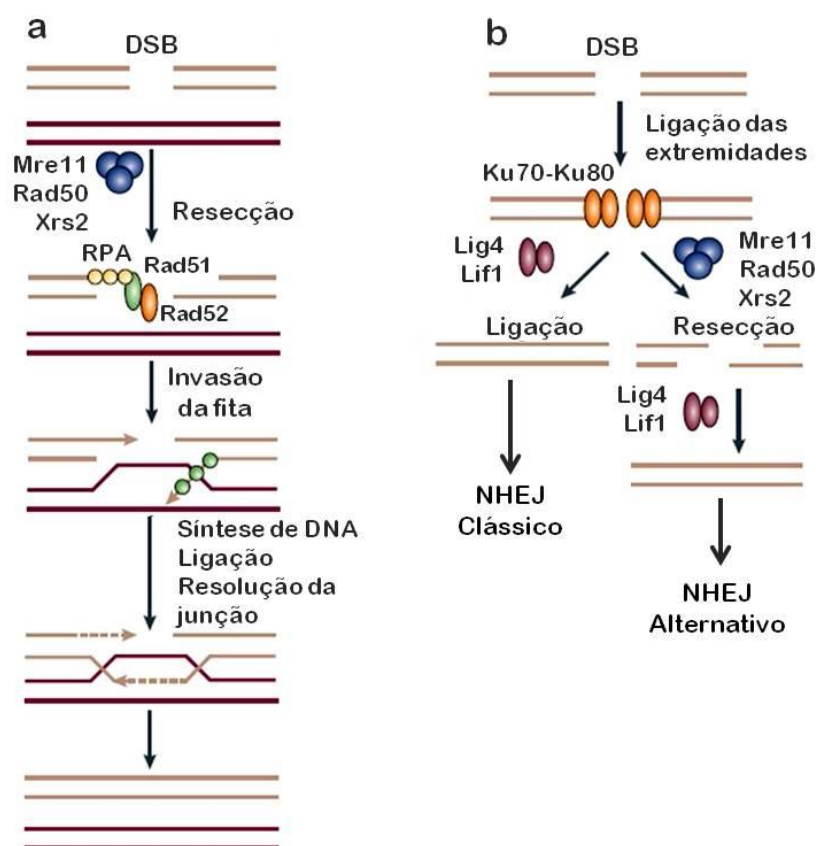


Figura 9. Reparação de uma quebra-dupla no DNA (DSB) pelas vias de recombinação homóloga (HR) e não homóloga (NHEJ). (a) **HR:** A DSB é reconhecida pelo complexo MRX, que processa as extremidades do DNA (resecção) formando regiões de fita simples 3' (ssDNA). A proteína RPA liga-se ao ss-DNA e recruta Rad51 e Rad52 para a DSB. RPA e Rad52 auxiliam na localização de Rad51 sobre o ss-DNA, formando filamentos de nucleoproteínas ssDNA-Rad51, que buscam por região de homologia na fita intacta da cromátide-irmã. Ao encontrar a região de homologia, ocorre a invasão da fita e a formação da junção. A síntese de DNA pelas polimerases preenche a quebra. A ligação e a

resolução da junção das duas hélices completa a reparação, livre de erros. **(b) NHEJ:** O complex Ku liga-se às extremidades da DSB (em mamíferos, Ku forma um complexo com a DNA-PKcs). Ku mantém as duas extremidades da quebra próximas, facilitando a ligação pelo complexo ligase 4 (Lig4) e Lif1. Alternativamente, pode ocorrer resecção pelo complexo MRX nas extremidades da quebra, desligando o complexo Ku. O processamento por MRX, seguido pela ligação mediada por Lig4-Lif1, une as regiões ss-DNA onde encontra micro-homologia. Esta via geralmente leva à reparação sujeita a erros. Adaptada de VAN ATTIKUM & GASSER (2005).

4.2.1 O complexo MRX

Os genes que codificam os componentes do complexo MRX foram identificados em *S. cerevisiae*, durante triagens genéticas para mutantes hiper-sensíveis a agentes que danificam o DNA (*RAD50* - GAME & MORTIMER, 1974; *XRS2* - IVANOV *et al.*, 1992; *MRE11* - AJIMURA *et al.*, 1993). O conhecimento sobre a estrutura deste complexo proteico aumentou drasticamente na última década (RUPNIK *et al.*, 2010). O complexo MRX (Mre11p/Rad50p/Xrs2p; MRN em humanos - Mre11p/Rad50p/Nbs1p) é rapidamente recrutado para os sítios de dano no DNA e liga-se a regiões de quebras, mantendo-as próximas. Outra função bioquímica importante que este complexo apresenta é a capacidade de realizar incisões no esqueleto fosfodiéster do DNA com sua atividade endonuclásica em ss-DNA e de hidrólise de ATP (RUPNIK *et al.*, 2010).

A proteína Mre11 é o primeiro fator a detectar os sítios de DSBs, sendo que esta interação induz a autoativação da cinase Tel1 (ATM), que fosforila as proteínas Mre11 e Xrs2 (D'AMOURS & JACKSON 2002; LISBY & ROTHSTEIN, 2004). A cinase Mec1 (ATR) também pode interagir com o complexo MRX na resposta a DSBs, de forma independente de Tel1p (RUPNIK *et al.*, 2010). Mre11p consiste no núcleo do complexo MRX, e interage de forma independente com Rad50p e Xrs2p. Estudos *in vitro* demonstraram que esta proteína possui atividade de 3'-exonuclease em ss-DNA, atividade endonucleásica em ss- e ds-DNA e atividade de abertura de estruturas *hairpin* (FURUSE *et al.*, 1998; PAULL & GELLERT, 1998; USUI *et al.*, 1998; TRUJILLO & SUNG, 2001). Entretanto, foi demonstrado que a atividade nucleásica de MRX não é necessária para a sinalização inicial de *checkpoint* (KROGH *et al.*, 2005).

Rad50p mantém as extremidades de DNA próximas (Figura 10), auxiliando no processo de reparação de DSBs (TSUKAMOTO *et al.*, 2005; D'AMOURS & JACKSON, 2002). A região central de Rad50p é composta por uma estrutura *coiled-coil*, que pode dobrar-se sobre si através de uma região articulada, formando um domínio ATPase. Mre11p liga-se à região *coiled-coil* de Rad50p, que fica próxima a este domínio ATPase e contém íons Zn^{2+} . Estes dados sugerem uma função de 'ponte' mediada por metal para as regiões *coiled-coils* de Rad50, ligando as duas extremidades danificadas do DNA (RUPNIK *et al.*, 2010). Além disso, a ligação de Rad50p estimula a atividade exonucleásica de Mre11p, enquanto regula negativamente sua atividade endonucleásica, prevenindo a degradação excessiva do DNA (GHOSAL & MUNIYAPPA, 2007).

A proteína Xrs2 é a menos conservada do complexo nos diferentes organismos e não possui atividade enzimática conhecida. Esta proteína desempenha uma função reguladora do complexo MRX, visto que é essencial para a localização nuclear de Mre11 e Rad50 (TSUKAMOTO *et al.*, 2005).

Recentemente foi demonstrado que o complexo MRX, juntamente com a endonuclease Sae2, promove a resecção das extremidades 5' do DNA na reparação de DSBs (SHIM *et al.*, 2010). Sae2 também auxilia MRX na abertura de estruturas tipo *hairpin* no DNA (LENGSFELD *et al.*, 2007). Recentemente, foi demonstrado que a proteína Pso2 também possui atividade endonucleásica específica para a abertura de *hairpins* completamente fechados (TIEFENNACH & JUNOP, 2012). Entretanto, a interação entre MRX e Pso2p não é epistática para esta atividade (LAM *et al.*, 2008), o que pode ser explicado pela diferente afinidade das proteínas: MRX tem atividade reduzida para a abertura de *hairpins* completamente fechados, enquanto que Pso2p tem pouca atividade na abertura de *hairpins* em regiões de longas repetições invertidas (LOBACHEV *et al.*, 2002).

Adicionalmente, o complexo MRX é necessário para recrutar Dna2p, Exo1p e Sgs1p para o sítio da lesão. A resecção mais extensa é realizada pela 5'-exonuclease Exo1, ou pela combinação das atividades do complexo STR (Sgs1p-Top3p-Rmi1p) com Dna2p. Na ausência de MRX-Sae2p, Exo1p e Sgs1p, não ocorre processamento das extremidades do DNA, resultando no bloqueio completo da reparação por homologia (SYMINGTON & GAUTIER, 2011).

Mutações nos componentes do complexo MRN em humanos levam a doenças genéticas caracterizadas pela hipersensibilidade à radiação ionizante, instabilidade genômica e imunodeficiência. Predisposição ao câncer tem sido associada com a Síndrome de quebra de Nijmegen (*Nijmegen breakage syndrome*, NBS), causada por mutações no gene NBS1. Mutações no gene MRE11 podem levar a uma doença semelhante à Ataxia Telangiectasia (*Ataxia telangiectasia-like disorder*, ATLD) (DZIKIEWICZ-KRAWCZYK, 2008).

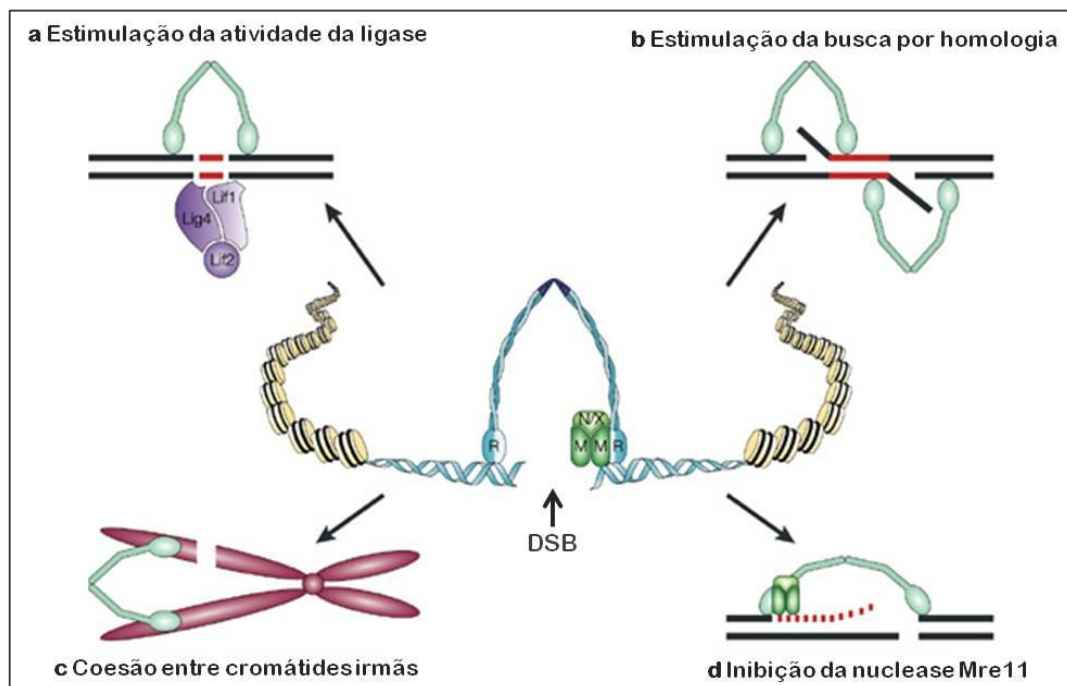


Figura 10. Atividade de formação de ponte entre extremidades de DNA da proteína Rad50. Estas funções de Rad50 poderiam estimular a resposta celular a danos no DNA de várias formas. **(a)** Manter duas extremidades de DNA próximas pode estimular a ligação pelo aumento da concentração local de substrato para o complexo Lig4. **(b)** Estimulação da recombinação homóloga pelo aumento da probabilidade de duas regiões homólogas se encontrarem. **(c)** A ligação de Rad50 nas cromátides danificada e intacta na fase G2 poderia estabilizar o braço danificado do cromossomo (função similar às coesinas), estimulando o processamento de quebras duplas no DNA. **(d)** Rad50 poderia inibir a atividade de Mre11 através de restrições estruturais, o que pode ser útil para a sinalização da DSB. Adaptada de D'AMOURS & JACKSON, 2002.

4.3 Reparação por excisão de bases (BER) e reparação de bases mal-emparelhadas (MMR)

BER é uma via de reparação livre de erros, que processa lesões que causam pouca distorção no dúplice de DNA, tais como bases danificadas pela metilação, desaminação, alquilação e oxidação, ou ainda bases que foram erroneamente incorporadas durante a replicação (ATAIAN & KREBS, 2006). Nesta via, os danos são reconhecidos por uma DNA glicosilase (Figura 11), que remove a base errônea do DNA, formando um sítioapurínico/apirimídico ou abásico (AP). Em seguida, uma AP endonuclease ou DNA glicosilase/AP liase cliva a ligação fosfodiéster do DNA, e uma DNA polimerase livre de erro insere o nucleotídeo correto (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

Recentemente, proteínas da via BER foram relacionadas com a reparação de ICLs, dependendo da fase do ciclo celular e do mecanismo de reconhecimento da lesão (MUNIANDY *et al.*, 2010). Evidências sugerem que uma resposta tradicional do BER possa atuar como um mecanismo alternativo ao NER e HR para a resistência a agentes indutores de ICLs (COUVÉ-PRIVAT *et al.*, 2007; COUVÉ-PRIVAT *et al.*, 2009).

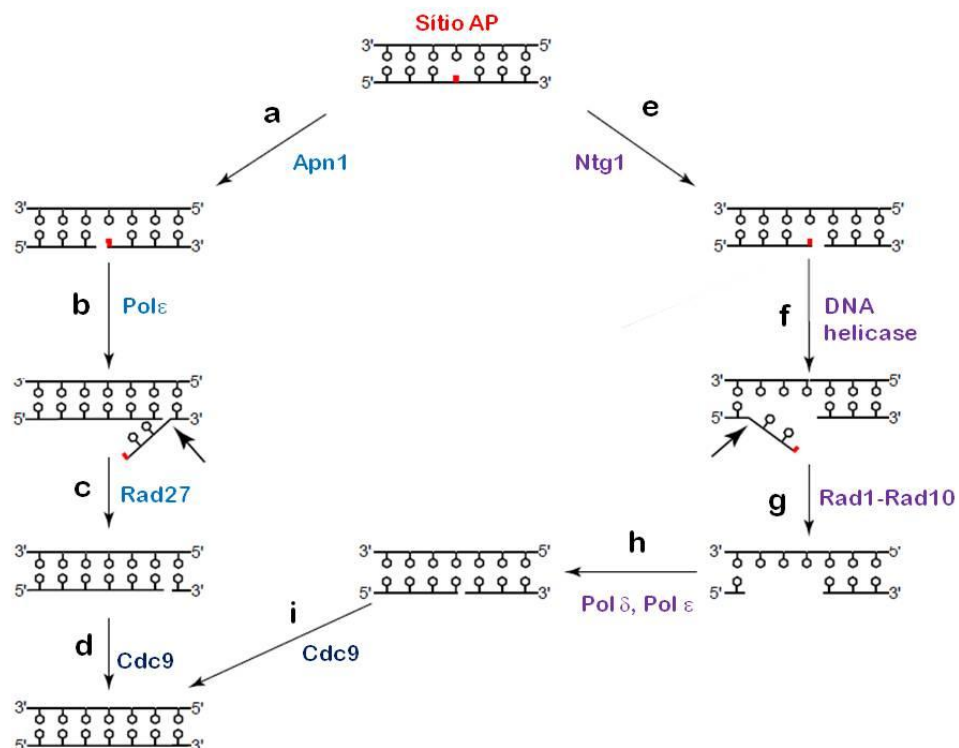


Figura 11. Esquema da via de reparação por excisão de bases (BER) em *S. cerevisiae*. A base danificada é removida pela DNA glicosilase, formando um sítio AP. (a-

d) A maior parte dos sítios AP são reparados pela AP endonuclease (Ape1), DNA polimerase (Pol ϵ), 5'-flap endonuclease (Rad27) e uma DNA ligase (Cdc9). **(e-i)** Uma fração menor de sítios AP é clivada por AP liases (Ntg1, Ntg2 ou Ogg1), seguida pela clivagem por Rad1-Rd10. Adaptada de BOITEUX & GUILLET, 2010.

A reparação por MMR (*mismatch repair*) também ocorre pela excisão livre de erros, que corrige mal-emparelhamentos de pares de base no DNA gerados durante a replicação ou HR, ou que foram causados por agentes genotóxicos (JEPPESEN *et al.*, 2011) (Figura 12). Falhas nesta via de reparação aumentam significativamente as taxas de mutagênese e de instabilidade genômica, estando associadas com o desenvolvimento de tumores em humanos (LI, 2008).

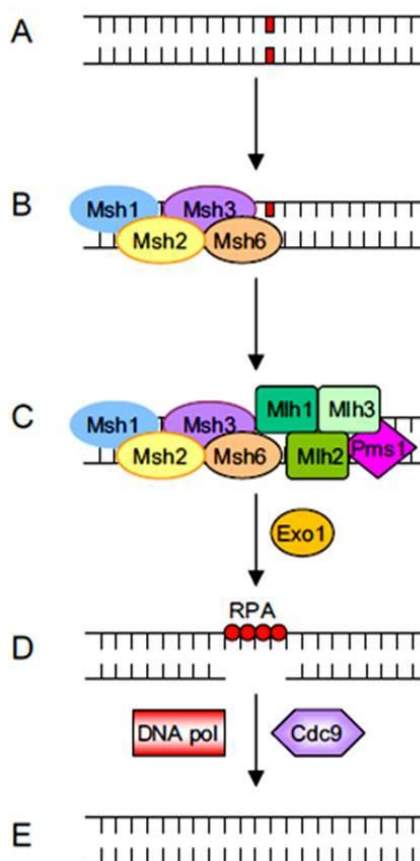


Figura 12. Esquema da reparação por MMR em leveduras. As bases mal-emparelhadas **(a)** são reconhecidas pelas proteínas Msh1, Msh2, Msh3 e Msh6. **(b)** Em seguida, ligam-se Mlh1, Mlh2, Mlh3 e Pms1 às proteínas de reconhecimento. Juntas, promovem a clivagem do nucleotídeo que contém a base mal-emparelhada **(c)**. A

exonuclease Exo1 remove o fragmento de DNA e a RPA liga-se às regiões ss-DNA (**d**). A enzima DNA polimerase ressintetiza o fragmento e a ligase Cdc9 une as extremidades. Modificado de ATAIAN & KREBS (2006).

4.4 Síntese translesão (TLS) e Reparação pós-replicativa (PRR)

Estas vias (grupo de epistasia RAD6) são responsáveis pela tolerância celular a danos que bloqueiam a replicação do DNA (NOLL *et al.*, 2006), e também pela indução de mutagênese em células de levedura (LAWEWNCE, 1994). Normalmente estas lesões são reparadas pelas vias BER ou NER, mas quando estes mecanismos não estão disponíveis, a síntese translesão é utilizada pela célula para reverter o efeito letal causado pelo bloqueio da replicação (NOLL *et al.*, 2006).

A replicação da fita danificada pode ocorrer pela TLS, na qual uma DNA polimerase (Pol) especializada insere um nucleotídeo no lado oposto à base danificada, e então prolonga a cadeia (Figura 13) (GAN *et al.*, 2008). Dependendo do tipo de lesão, a via TLS pode utilizar dois tipos de DNA polimerases translesão: a DNA pol zeta (ζ) - passível de erros, ou a DNA pol eta (η) - livre de erros (NOLL *et al.*, 2006; FRIEDBERG *et al.*, 2006).

Em eucariotos, a ubiquitinação de PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*, Pol30) pelas proteínas Rad6-Rad18 desempenha um papel central na regulação destas vias de tolerância a danos: a mono-ubiquitinação da PCNA ativa as polimerases Pol η (Rad30) e Pol ζ (Rev3 e Rev7), da via TLS; por outro lado, a poli-ubiquitinação da PCNA, dependente do complexo Mms2-Ubc13-Rad5, permite a reparação de descontinuidades formadas no DNA sintetizado a partir da fita danificada, pela via PRR (GANGAVARAPU *et al.*, 2006).

A inativação da Pol η causa o aumento da incidência de mutagênese induzida por UV em leveduras e humanos, sendo que em humanos causa uma síndrome de propensão ao câncer, que é uma forma variante de *xeroderma pigmentosum* (MASUTANI *et al.*, 1999). Por outro lado, mutantes de levedura para genes da TLS apresentam redução ou bloqueio na mutagênese induzida por agentes indutores de ICLs (NOLL *et al.*, 2006).

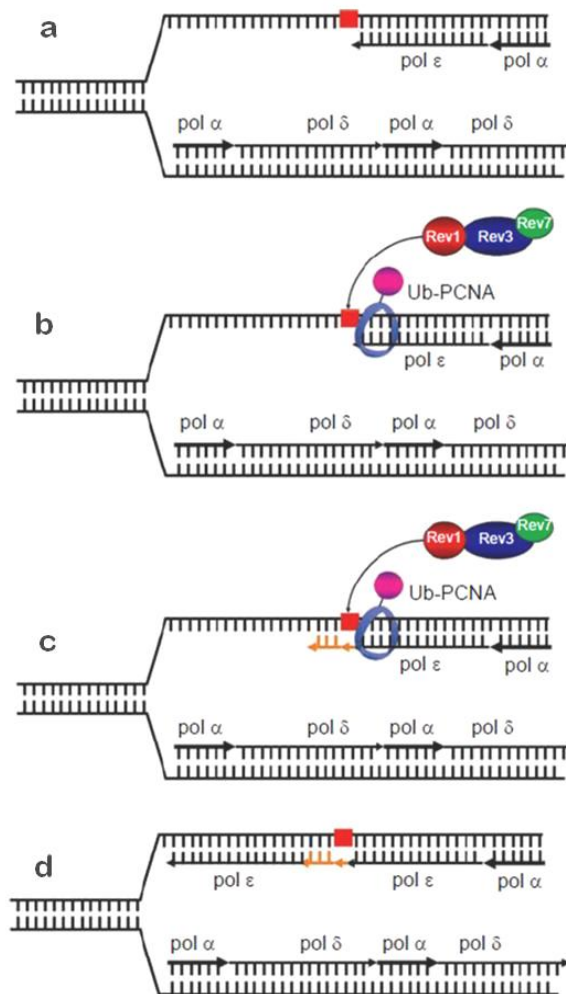


Figura 13. Reparação por síntese translesão (TLS) em leveduras. Estão representadas as fitas leading (acima) e lagging (abaixo) do DNA, durante a replicação na fase S. **(a)** As DNA polimerases replicativas (Pol δ , Pol ϵ), são responsáveis pela replicação do DNA genômico, porém não são capazes de ultrapassar lesões e param a replicação ao encontrar uma lesão (quadrado vermelho). **(b)** A parada da forquilha de replicação ativa o complexo Rad6-Rad18, que mono-ubiquitina a PCNA. A ub-PCNA dissocia as polimerases replicativas e recruta a polimerase especializada Pol ζ (Rev3/Rev7) associada a Rev1, capaz de ultrapassar a lesão. **(c)** A Pol ζ , ou possivelmente a Rev1, insere um nucleotídeo no filamento oposto à lesão, e Pol ζ realiza a extensão. **(d)** Após ultrapassar a lesão, o complexo envolvendo Rev3/Rev7 e Rev1 é dissociado, Ub-PCNA é removido, e as polimerases replicativas são reassociadas, dando continuidade à síntese de DNA. Adaptada de GAN et al, 2008.

4.5 Os genes *PSO* na reparação de ICLs

A partir de estudos genéticos com a finalidade de descobrir novos fatores envolvidos na reparação de ICLs, HENRIQUES & MOUSTACCHI (1980) isolaram uma nova classe de linhagens mutantes de *S. cerevisiae* sensíveis à fotoadição de psoralenos mono- (3-CPs) e bifuncionais (8-MOP), as quais foram posteriormente denominadas de mutantes *pso* (revisado em BRENDEL *et al.*, 2003). A análise molecular desses genes e a caracterização fenotípica de seus alelos mutantes têm progredido consideravelmente. Atualmente, dez genes *PSO* estão caracterizados fenotipicamente (Tabela 1); destes, sete genes codificam proteínas que estão envolvidas na reparação de lesões no DNA geradas pela fotoativação de psoralenos e por outros mutágenos, sendo que dois destes genes não estão envolvidos diretamente na reparação de lesões do DNA (para revisão, ver BRENDEL E HENRIQUES, 2001; BRENDEL *et al.*, 2003).

4.5.1 O gene *PSO2*

Historicamente, os mutantes *pso2* (HENRIQUES & MOUSTACCHI, 1980) e *snm1* (RUHLAND *et al.*, 1981) (posteriormente identificados como alelos) foram isolados pela sua alta sensibilidade a agentes químicos indutores de ICLs, sendo que esta sensibilidade não depende da natureza da base nitrogenada envolvida na ICL (BRENDEL E HENRIQUES, 2001). O gene *PSO2* de *S. cerevisiae* codifica uma proteína nuclear de 76 kDa, que atua principalmente na reparação de ICLs (para revisão, ver BRENDEL *et al.*, 2003). A proteína Pso2 pertence à superfamília das metalo- β -lactamases (MBL), dentro da qual é a fundadora de um grupo distinto, a família β -CASP (CPSF, Artemis, SNM1, Pso2) (Figura 14), que atua especificamente em ácidos nucleicos (CALLEBAUT *et al.*, 2002) (para maiores detalhes, ver revisão no Capítulo 1).

PSO2 foi inicialmente atribuído ao grupo de epistasia RAD3 (NER); entretanto, mutantes para este gene acumulam DSBs após exposição a agentes indutores de ICLs, mostrando que a proteína Pso2 atua num passo após a incisão da lesão, que é realizada pelas proteínas da via NER (MAGAÑA-SCHWENCKE *et al.*, 1982; WILBORN & BRENDEL, 1989).

Tabela 1. Propriedades das proteínas codificadas pelos genes *PSO* e fenótipos dos seus alelos mutantes.

Gene/Alelo	Função da proteína	Fenótipo do mutante
<i>PSO1/REV3</i>	Subunidade catalítica da polimerase translesão Pol ζ	Sensível à radiação e a agentes mutagênicos químicos; baixa mutabilidade
<i>PSO2/SNM1</i>	5'-exonuclease; ^(a) endonuclease específica para estruturas <i>hairpin</i> no DNA	Sensível ao tratamento com todos os agentes indutores de pontes no DNA; bloqueio na mutação por agentes indutores de ICLs
<i>PSO3/RNR4</i>	Ribonucleotídeo redutase	Redução na mutabilidade induzida e recombinação; células não atingem a fase estacionária
<i>PSO4/PRP19</i>	Proteína associada ao spliceossoma	Sensível a agentes mutagênicos, não recombina em mitose, baixa mutabilidade e defectivo em esporulação
<i>PSO5/RAD16</i>	DNA helicase	Sensível à UVC e lesões oxidativas
<i>PSO6/ERG3</i>	Ergosterol desaturase	Sensível a danos oxidativos
<i>PSO7/COX11</i>	Associa-se ao complexo citocromo c-oxidase	Células sensíveis à 4-NQO
<i>PSO8/RAD6</i>	Enzima conjugada à ubiquitina (E2); atua na reparação pós-replicativa (forma heterodímero com Rad18)	Sensível à UVC e a vários agentes mutagênicos; mutagênese reduzida
<i>PSO9/MEC3</i>	Controle de ponto de checagem em resposta a danos no DNA na fase G2; subunidade do complexo heterotrimérico Rad17p-Mec3p-Ddc1p	Sensível a vários agentes mutagênicos; mutagênese reduzida
<i>PSO10/MMS21</i>	^(b) Sumoilação de proteínas de reparação do DNA	sensível à UVC; mutagênese reduzida; bloqueado em esporulação

Adaptada de HENRIQUES *et al.*, 1997; BRENDEL & HENRIQUES, 2001.

^(a) TIEFENBACH & JUNOP, 2012.

^(b) HOCH *et al.*, 2008.

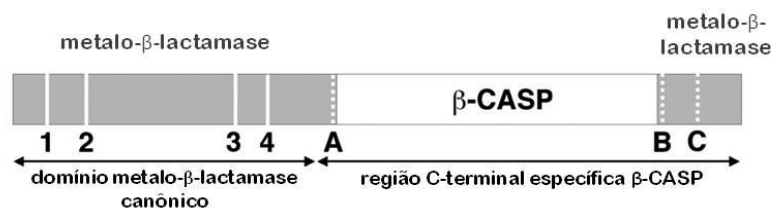


Figura 14. Esquema da organização dos domínios metalo- β -lactamase e β -CASP. Os motivos conservados estão incluídos no domínio metalo- β -lactamase descontínuo (cinza), no qual se insere o domínio β -CASP (branco). Os motivos 1-4 são típicos da superfamília metalo- β -lactamase; os motivos A-C são específicos para a família β -CASP. Adaptada de DE VILLARTAY *et al.*, 2009.

Mutantes *pso2* também não apresentam aumento de resistência na fase G2 ou em células diploides, aspectos que são observados em células selvagens (CASSIER *et al.*, 1980; HENRIQUES & MOUSTACCHI, 1980). Curiosamente, a reparação de uma ICL induzida por psoraleno no DNA de um plasmídeo exógeno não é prejudicado em mutantes *pso2* de *S. cerevisiae*, em contraste com mutantes para as vias NER e HR (ver) (MAGAÑA-SCHWENCKE & AVERBECK, 1991). Este fato sugere a existência de uma via alternativa para a reparação de ICLs, que não depende da proteína Pso2. Esta via pode ser representada pelo mecanismo semelhante à via da Anemia de Fanconi (via FA-like), recentemente identificada em leveduras (DAEE *et al.*, 2012; WARD *et al.*, 2012) (ver Capítulo 1 desta tese).

Foram identificadas cinco proteínas ortólogas em humanos para Pso2p, sendo que duas destas atuam no metabolismo do RNA (Elac2 e CPSF), enquanto as outras três atuam no metabolismo de DNA (SNM1A, SNM1B/Apolo e SNM1C/Ártemis) (Figura 15). Detalhes sobre as três últimas proteínas são encontrados na tabela 1 do Capítulo 1 e no Capítulo 2 desta tese.



Figura 15. Estrutura dos domínios metalo- β -lactamase (MBL) e β -CASP de Pso2 de *S. cerevisiae* e dos ortólogos humanos envolvidos no processamento de DNA. A linha amarela indica a localização do resíduo ácido aspártico 736, cuja mutação inativa

tanto a proteína Pso2 de levedura, como suas ortólogas humanas. Adaptada de HAZRATI *et al.*, 2008.

4.6 A origem e a reparação de quebras-duplas (DSBs) associadas a ICLs

As DSBs são formadas em *S. cerevisiae* após a indução de ICLs com os agentes 8-MOP+UVA e HN2, por exemplo, enquanto que tratamentos com os agentes monofuncionais UVC e NH1 não são capazes de gerar esta lesão (LEHOCKZÝ *et al.*, 2007). Acredita-se que estas DSBs são resultantes do processamento de forquilhas de replicação bloqueadas por ICLs não reparadas. Também é possível que SSBs produzidas devido à incisão da ICL sejam transformadas em DSBs durante a replicação. Tais hipóteses são sustentadas pela demonstração de que DSBs não ocorrem em leveduras quiescentes após o tratamento com 8-MOP, CDDP e HN2 (MAGAÑA-SCHWENCKE *et al.*, 1982; MCHUGH *et al.*, 2000; DARDALHON *et al.*, 2007). Observações semelhantes foram feitas em células de mamíferos tratadas com HN2 e CDDP (DE SILVA *et al.*, 2000). As DSBs associadas a ICLs diferem daquelas induzidas pela radiação ionizante e pelas endonucleases de restrição, sendo reparadas de forma muito mais lenta (NIEDERNHOFER *et al.*, 2004).

Os mecanismos dependentes de homologia e micro-homologia para a reparação de DSBs iniciam com a degradação nucleolítica da fita 5' do DNA, gerando regiões 3' ss-DNA, um processo conhecido como resecção 5'-3'. Em *S. cerevisiae*, a resecção é iniciada pelo complexo MRX (Figura 16), que juntamente com Sae2p pode remover oligonucleotídeos da fita 5', resultando em processamento limitado das extremidades do DNA (LENGSFELD *et al.*, 2007; MIMITOU & SYMINGTON, 2008). A HR não é importante para a reparação de ICLs em células haplóides de levedura na fase estacionária, visto que poucas DSBs são formadas e não há DNA homólogo disponível para a recombinação (SIEDE & BRENDDEL, 1982; MCHUGH *et al.*, 2000).

De forma semelhante aos mutantes para genes da PRR e TLS, mas em contraste com os mutantes para a via NER, células *pso2* são capazes de clivar ICLs e produzir DSBs, mas não ocorre a recuperação do DNA de alta massa molecular (MAGAÑA-SCHWENCKE *et al.*, 1982; WILBORN & BRENDDEL, 1989; GROSSMANN *et al.*, 2000).

Quando as DSBs são formadas em ambos os lados da ICL, podem ser reparadas pela via NHEJ. Isto resultaria na deleção de seqüências em torno da ICL. Entretanto, células de levedura mutantes para NHEJ não são sensíveis a agentes indutores de ICLs, o que leva a conclusão de que esta via não possui um papel importante na reparação de ICLs (MCHUGH *et al.*, 2000).

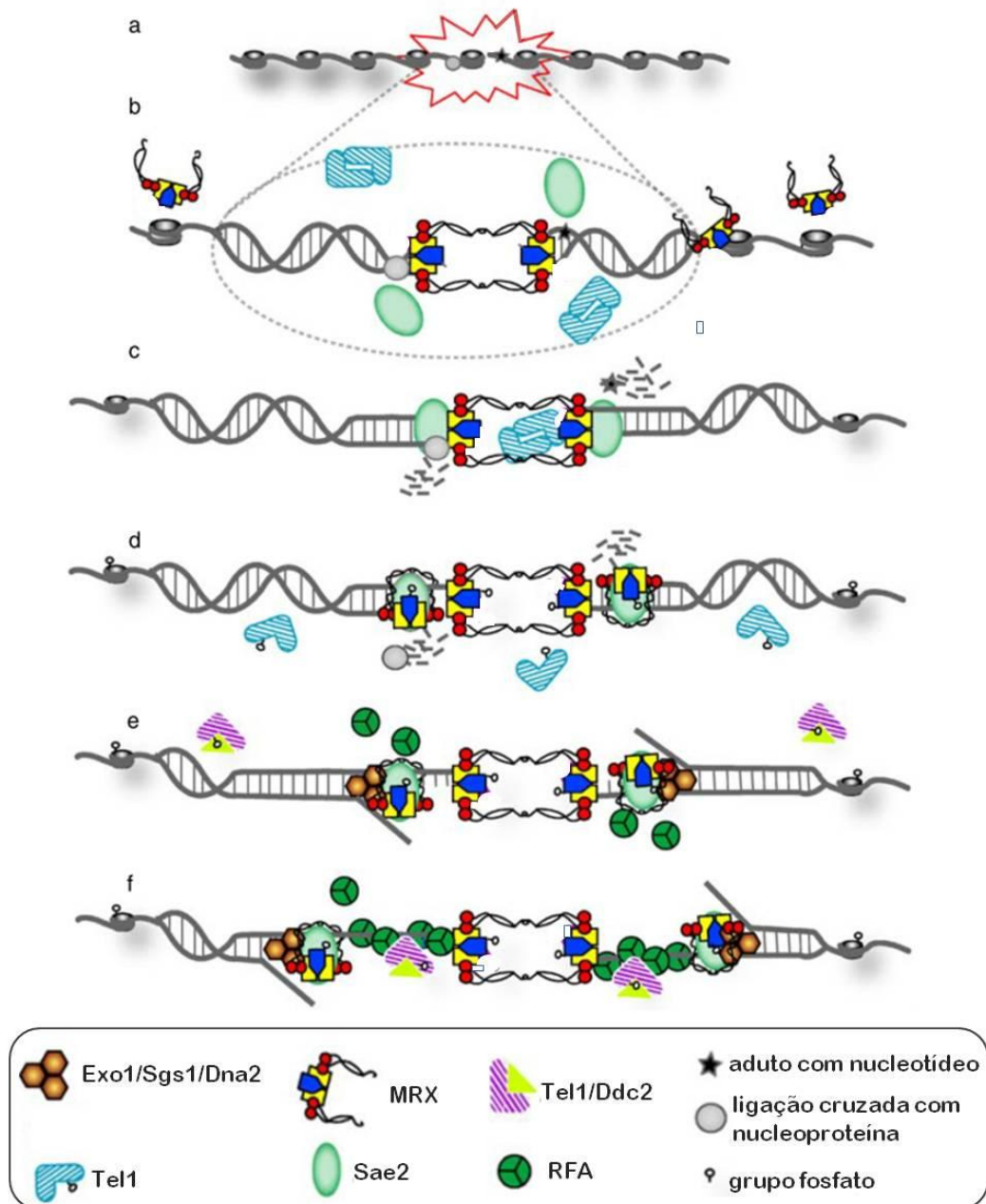


Figura 16. Primeiras etapas da resposta à formação de quebras duplas (DSBs) no DNA. (a) Formação de uma DSB, que geralmente possui extremidades complexas ('sujas'), contendo adutos entre nucleotídeos ou ligações cruzadas com proteínas. (b) O

complexo MRX é imediatamente recrutado e liga-se nas extremidades da quebra. (c) MRX/Sae2p pode fazer o processamento ('limpeza') inicial das extremidades, gerando pequenos oligonucleotídeos. A cinase Tel1 é recrutada e ativada. (d) Tel1p ativada fosforila os substratos *downstream*, como MRX. A cascata de sinalização é ativada. O complexo MRX mantém próximas as extremidades processadas do DNA. (e) Nucleases e helicases fazem o processamento adicional das extremidades. (f) Formam-se filamentos RFA-ssDNA e Mec1p/Ddc2p são recrutados para o sítio da quebra. Adaptada de RUPNIK *et al.*, 2010.

Um esquema geral proposto para a reparação de ICLs em eucariotos é mostrado na Figura 17.

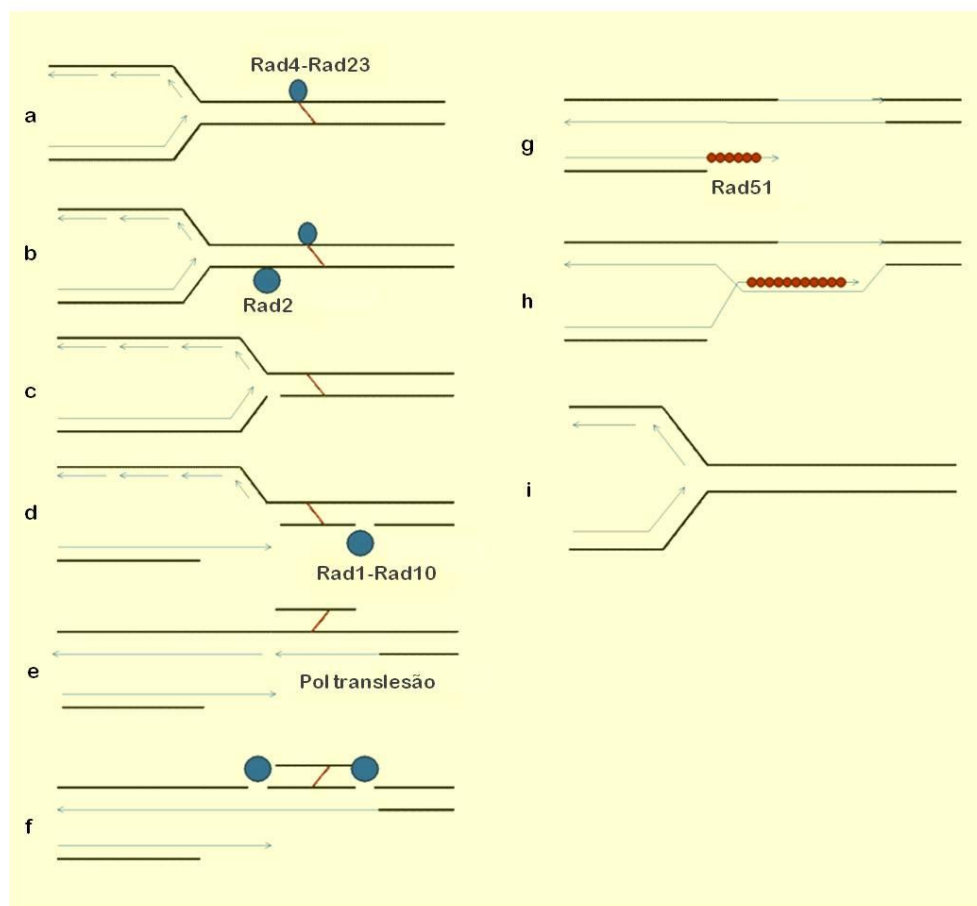


Figura 17. Esquema de reparação de ICL em eucariotos. (a) A forquilha de replicação é bloqueada pela lesão, sendo reconhecida pelas proteínas do NER Rad4p/Rad23p. (b) Após, Rad2p cliva uma das fitas do DNA na região 3' da ICL (c), sendo que o complexo Rad1p-Rad10p cliva na região 5' (d). (e) A região clivada do DNA, contendo o dano, é liberada e a fita oposta serve de molde para polimerases translesão. (f)

Reações semelhantes de clivagem ocorrem na fita oposta, removendo completamente a sequência que contém a ICL. **(g)** Polimerases preenchem esta lacuna, que é selada por ligases. Durante a replicação celular, as DNA polimerases podem encontrar estas lacunas causadas pela reparação do DNA, gerando uma DSB. Nesse caso, uma das extremidades da quebra invade a fita reparada, utilizando a maquinaria da HR **(h)**, restaurando a forquilha de replicação **(i)**. Durante a reparação de ICL independente de replicação, não é formada DSB e, por isso, a HR não é necessária. Adaptada de TIEFENBACH, 2011.

4.7 Reparação de estruturas do tipo *hairpin*

Vários tipos de estruturas são formadas em resposta a danos, à reparação e à recombinação no DNA, cujo processamento requer nucleases especializadas. Uma dessas classes de estruturas são os *hairpins*, formados durante a recombinação V(D)J (em eucariotos superiores), na extrusão de sequências com palíndromos, durante a transposição do DNA, e também em alguns tipos DSBs (TIEFENBACH & JUNOP, 2012). Os *hairpins* formados no DNA representam uma grande ameaça à estabilidade genômica, devendo ser removidos ou abertos por nucleases especializadas para permitir sua reparação.

As células possuem dois mecanismos conhecidos para a reparação de *hairpins* (Figura 18). O primeiro envolve o complexo MRX (MRN) (descrito na seção 4.2.1), cuja atividade endonuclease estrutura-específica é importante para a estabilidade das sequências de repetições invertidas (LOBACHEV *et al.*, 2002). MRX, juntamente com Sae2, catalisa a remoção completa de estruturas *hairpin*. Estas proteínas também atuam em estruturas cruciformes danificadas, que tenham sido convertidas em *hairpins* contendo uma incisão em uma das cadeias do DNA, distal à extremidade (*cap*). MRX abre uma lacuna a partir da incisão existente utilizando sua atividade 3'-exonuclease, e estimula Sae2 a clivar o ss-DNA resultante na fita oposta, completando assim a remoção do *hairpin* (LENGSFELD *et al.*, 2007).

O segundo mecanismo de reparação de *hairpins* é representado pela nuclease SNM1C/Ártemis, ortóloga à Pso2. Entretanto, a atividade de remoção de *hairpins* pela Ártemis parece estar restrita à reparação de DSBs resultantes da recombinação V(D)J. A atividade endonucleásica de Ártemis gera incisões no ápice das estruturas *hairpin*, ou muito próximo dele, originando extremidades livres para posterior processamento e

reparação (MA *et al.*, 2002). Uma atividade similar foi descrita para o complexo MRX-Sae2 em leveduras (LOBACHEV *et al.*, 2002).

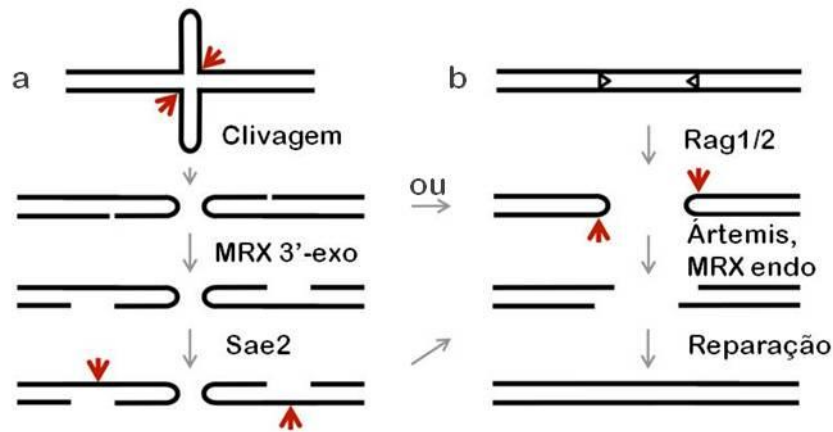


Figura 18. Esquema do processamento de *hairpins* no DNA. (a) Estruturas cruciformes são formadas após extrusão de DNA em sequências de repetições invertidas. Após a resolução da estrutura cruciforme, forma-se um *hairpin* com uma incisão, que pode ser processado pela atividade 3'-exonuclease de MRX, ou pode ser ligado diretamente, formando um *hairpin* completamente fechado. A atividade 3'-exonuclease de MRX é capaz de processar o hairpin que contém uma incisão. Em seguida, Sae2 reconhece a região ss-DNA gerada pela Mre11 e cliva a fita oposta, removendo completamente o *hairpin*. (b) Estruturas *hairpin* são formadas durante a recombinação V(D)J. Estes *hairpins* completamente fechados podem ser abertos pela endonuclease SNM1C/Ártemis ou pelo complexo MRX/N. Adaptada de TIEFENBACH & JUNOP, 2012.

Objetivos

1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como principal objetivo investigar a interação da proteína Pso2 com as proteínas que atuam no início da sinalização e da reparação das quebras duplas no DNA, originadas da resolução de pontes intercadeia, visando ampliar a caracterização da relação entre as diferentes vias de reparação envolvidas neste processo, em *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1. Objetivos específicos

1. Analisar as interações entre a nuclease Pso2, a cinase Sak1 e o complexo MRX na reparação de danos causados por agentes indutores de ICLs, utilizando linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e deficientes para os genes que codificam estas proteínas.
2. Avaliar a interação da via de reparação NHEJ com as proteínas Pso2 e Sak1 em resposta a lesões no DNA causadas por agentes indutores de ICLs, utilizando linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e deficientes para a proteína YKu70.
3. Investigar as relações da proteína Pso2 com as cinases de checagem de ciclo celular Tel1 (ATM) e Tor1 em resposta a agentes causadores de ICLs, utilizando linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e deficientes para estas proteínas.
4. Elaborar um modelo que demonstre a integração das vias de reparação que atuam na resolução de quebras duplas no DNA associadas a ICLs.

Capítulo I

New features on Pso2 protein family in DNA interstrand cross-link repair and in the maintenance of genomic integrity in *Saccharomyces cerevisiae*

A ser submetido para publicação na revista Fungal Genetics and Biology.

Review

New features on Pso2 protein family in DNA interstrand cross-link repair and in the maintenance of genomic integrity in *Saccharomyces cerevisiae*

Fernanda Mosena Munari^a, Temenouga Nikolova Guecheva^b and João Antônio Pêgas Henriques^{a,b,c}*

^a Biotechnology Center, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 91507-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Department of Biophysics, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 91507-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul (UCS), 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil

* Corresponding author:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Centro de Biotecnologia

Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43421, Campus do Vale

Caixa Postal 15005

91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

Tel.: + 55 51 3308 6069

Fax: +55 51 3308 6084

E-mail address: pegas@cbiot.ufrgs.br (J.A.P. Henriques)

Abstract

Pso2 protein, a member of the highly conserved metallo- β -lactamase (MBL) super family of nucleases, plays a central role in interstrand crosslink repair (ICL) in yeast. Pso2 protein is the founder member of a distinct group within the MBL superfamily, called β -CASP family. Three mammalian orthologs of this protein that act on DNA were identified - SNM1A, SNM1B/Apollo and SNM1C/Artemis. Yeast Pso2 and all three mammalian orthologs proteins have been shown to possess nuclease activity. Besides Pso2, ICL repair involves proteins of several DNA repair pathways. Over the last years, new homologs for human proteins have been identified in yeast. In this review, we will focus on studies that have suggested new sub-pathways in the mechanisms of ICL repair, such as microhomology-mediated end joining and recently identified conserved Fanconi Anemia pathway in yeast, besides findings from studies of our group.

Key words: Pso2/SNM1, interstrand crosslink repair, double strand breaks, *Sacharomyces cerevisiae*, bifunctional agents.

Introduction

DNA is constantly challenged by agents that can impose structural damage either on one or both strands of the DNA duplex. DNA interstrand crosslinks (ICLs) are among the most toxic forms of DNA damage because they affect both DNA strands, can block DNA replication and transcription, and consequently disrupt genetic information. Some environmental (e.g., UVC radiation) and endogenous (e.g., bifunctional electrophiles, such as malonic dialdehyde, a product of lipid peroxidation and the small glycolytic pathway metabolite acetaldehyde) agents may form ICLs, a fact that has triggered significant selection during evolution for the development of mechanisms that allow cells to repair and tolerate this lesion (Niedernhofer et al., 2003; Brendel et al., 2010; Wood, 2010). Understanding the repair of this crosslink is also very relevant because agents that induce ICLs are widely used in cancer chemotherapy and phototherapy (Dronkert and Kanaar, 2001; Noll et al., 2006; Wood, 2010).

Cells have the capacity to repair ICLs through highly complex DNA repair mechanisms, including nucleotide excision repair (NER), homologous recombination (HR), non-homologous end joining (NHEJ), translesion synthesis (TLS) and postreplication repair (PRR) (Henriques et al., 1997; McHugh et al., 2000; Brendel et al., 2003; Sarkar et al., 2006; Lehoczký et al., 2007). Additionally, several genes involved in ICL repair were originally identified in *S. cerevisiae*, named *PSO1* through *PSO10*. Eight of these genes (*PSO1-PSO5*, *PSO8-PSO10*) encode for proteins that are involved in the repair of DNA lesions generated by photoinduced psoralens and by other mutagens, while two, *PSO6* and *PSO7*, encode for proteins responsible for structural elements of the membrane and for a functional respiratory chain, respectively (Henriques et al., 1997; Brendel and Henriques, 2001; Brendel et al., 2003). *PSO2* gene has particularly attracted most attention because it encodes for a protein - Pso2p - identified as indispensable for repair of ICLs that are produced by a variety of bi- and poly-functional mutagens. Afterwards, this family of proteins was shown to be likewise important for repair function in humans (Brendel and Henriques, 2001; Bonatto et al., 2005; Hemphill et al., 2008; Cattell et al., 2010).

Over the last years, new homologs for human proteins have been identified in yeast; furthermore, sub-pathways in the already known DNA repair pathways have been

described (Symington and Gautier, 2011; McHugh et al., 2012; Ward et al., 2012). These facts lead to the proposition of a broader role for Pso2 protein in the maintenance of genomic stability. In the present review, we will focus on studies that have suggested new sub-pathways in the mechanisms of ICL repair, such as microhomology-mediated end joining (MMEJ) and recently identified conserved Fanconi Anemia (FA) pathway in yeast, besides findings from studies of our group.

Pso2/SNM1 Family – Discovery and Importance

The identification of *Saccharomyces cerevisiae* mutants hypersensitive to photoactivated psoralen (*pso2* mutants) (Henriques and Moustacchi, 1980) and to nitrogen mustard (*snm1* mutants) (Ruhland et al., 1981), in the 80's, led to the emergence of a new focus of interest related to the repair of ICLs, the most cytotoxic lesion caused by these agents. *PSO2* and *SNM1* genes were later identified to be allelic (Cassier-Chauvat and Moustacchi, 1988) and the standard nomenclature *PSO2* was adopted (Brendel and Henriques, 2001).

Pso2 protein is the founder member of a distinct group within the metallo- β -lactamase (MBL) superfamily, called β -CASP family. The well conserved β -CASP domain, named according to the names of its representative members (CPSF, Artemis, SNM1, Pso2) forms an insertion cassette within the MBL domain (Brendel and Henriques, 2001; Callebaut et al., 2002; Brendel et al., 2003; Bonatto et al., 2005; Dominski, 2007; Cattell et al., 2010). Hydrophobic cluster analysis (HCA) allowed this family of proteins to be identified in all three life domains – eukaryotes, bacteria and archea (Callebaut et al., 2002; Bonatto et al., 2005a).

New studies over the years have led to the identification of five Pso2p homologs in mammals and humans. Two of these proteins, *CPSF73* and *ELAC2*, are involved in RNA processing (Jenny et al., 1996; Takaku, 2003), while *SNM1A*, *SNM1B/Apollo* and *SNM1C/Artemis* have roles in DNA metabolism and cell cycle regulation (Dronkert et al., 2000; Moshous et al., 2001; Demuth et al., 2004; Ishiai et al., 2004; Bae et al., 2008). The relevant aspects for the topics addressed in this paper about the proteins *SNM1A*, *B* and *C*, which are involved in DNA repair processes, are summarized in Table 1. The structure and function of Pso2 and SNM1 proteins have been described in recent reviews (Bonatto et al., 2005b; Dominski, 2007; Cattell et al., 2010; Yan et al., 2010), therefore the interested

reader is referred to these reviews for more detailed descriptions of the chemical and biochemical reactions involved.

ICL Repair and Cancer Treatment: a Useful and Dangerous Lesion

ICLs are induced by bifunctional drugs, as well as by endogenous agents formed by lipid, resulting in covalent linkage between both DNA strands, thereby preventing strand separation of DNA duplex and blocking essential processes on DNA metabolism (Schärer, 2005; Lehoczký et al., 2007). Besides ICLs, bifunctional agents also may induce the formation of intrastrand cross-links and DNA-protein cross-links, but the former is believed to be the critical cytotoxic lesion caused for most bi- and poly-functional agents (Dronkert and Kanaar, 2001).

The particular sensitivity of *pso2* mutants to ICL-inducing agents suggests a specialized role for Pso2p in the repair of double-strand breaks (DSBs) formed during repair of ICL lesions (Henriques and Moustacchi, 1980; Magaña-Schwencke et al., 1982; Barber et al., 2005; Lam et al., 2008). ICL-induced DSBs must differ in some aspects from other forms of DNA breaks, since *pso2* mutants possess a WT-like sensitivity to ionizing radiation that also produces, between other types of lesions, DSBs (Henriques and Brendel, 1990; Henriques et al., 1997). Moreover, *pso2* mutants are normal in repair of HO-induced DSBs (Li and Moses, 2003), which present DNA-ends able to be ligated or extended by DNA polymerases without further processing (also called 'clean ends') (Symington and Gautier, 2011). This indicates that ICLs may lead to the formation of DSBs that need to be processed in order to generate DNA intermediates accessible for repair proteins.

Many clinically important anticancer drugs are bifunctional agents, including psoralens activated by irradiation with UVA (PUVA therapy), mitomycin C, platinum compounds such as *cis*-diamminedichloroplatinum(II) (*cis*-platinun; *cis*-DDP), nitrogen mustards (e.g., mechlorethamine; HN2) and chlorambucil (Bauer and Povirk, 1997; McHugh et al., 2000; Noll et al., 2006). Additionally, the employment of organotellurium compounds in antiproliferative therapy has been suggested based on their cytotoxicity (Engman et al., 2000). Diphenyl ditelluride (DPDT), a potential prototype for development of new drugs, has shown to induce DSBs in mammalian cells (Degrandi et al., 2010). Moreover, cell survival assays with *S. cerevisiae* revealed *pso2* mutant to be highly sensitive to DTDF treatment, indicating that Pso2p plays an important role in repair of

lesions caused by this treatment (Cruz et al, 2012). However, significant levels of resistance against the agents used in cancer therapy are found in tumor cells, in large part due to DNA repair pathways that remove cross-link adducts from DNA (Ho and Schärer, 2010). Thus, the study of pathways involved in ICL repair is of great interest and may lead to the development of more effective protocols for the treatment of cancer.

Although the basic mechanisms and biochemical activities involved in ICL repair appear to be conserved throughout evolution, this is a complex process in eukaryotes, mainly because it involves several repair pathways and factors which may overlap, in a cell cycle-dependent manner (Dronkert and Kanaar, 2001; McHugh et al., 2001; Cattell et al., 2010; McVey, 2010). Several pathways can faithfully repair ICLs and maintain genomic integrity. Yeast cells require a combination of NER, HR, PRR and TLS to remove ICLs (Henriques and Moustacchi, 1981; McHugh et al., 2000; Grossmann et al., 2001; Dudás et al., 2007; Lehoczky et al., 2007; Shen and Li, 2010). A relatively detailed knowledge of these pathways has been accumulated by the efforts over several decades; however, more studies are needed to elucidate the precise mechanisms of ICL repair processes in eukaryotes (Muniandy et al., 2010; Daee et al., 2012).

New Functions Proposed for Pso2 Family of Nucleases

The Pso2 protein was first identified as a 5'-exonuclease in *S. cerevisiae* by Li and co-workers (Li et al., 2005). Recently, Tiefenbach and Junop have reported a structure-specific endonuclease activity to Pso2p for the opening of DNA hairpins in yeast. This activity was further shown to be required *in vivo* for repair of chromosomal breaks harboring closed hairpin ends (Tiefenbach and Junop, 2012). Both exo- and endonuclease activities of Pso2p depend on the same active site (Tiefenbach and Junop, 2012), composed by MBL and β -CASP domains (Callebaut et al., 2002). These findings provided the first evidence that Pso2p may function outside ICL repair (Tiefenbach and Junop, 2012). The ability of Pso2 to open fully-paired hairpins may suggest a function at least in part during ICL repair by processing DNA intermediates including DNA hairpins or hairpin-like structures (Brendel et al., 2003; Li and Moses, 2003; Tiefenbach and Junop, 2012), although the relevant physiological processes that generate DNA hairpin substrates for Pso2p remain to be elucidated (Brendel et al., 2003; Li and Moses, 2003; Tiefenbach and Junop, 2012).

Pso2 protein also has been implicated in processing of unhooked ICLs in yeast (Sarkar et al., 2006). This fact turns the mammalian homolog protein SNM1A as a candidate for end processing of unhooked ICLs in mammals, a step that greatly facilitates TLS to occur (Ho et al., 2011). The identification of Pso2 homologs in mammals and humans has led to the characterization of new functions for the conserved SNM1 domain (Table 1). Several protein–protein interactions have been mapped to this domain, indicating that SNM1 domain has biochemical functions in addition to its nuclease activities (Yan et al., 2010). All three proteins (SNM1 A, B, C) have been implicated in cell cycle checkpoint responses to different forms of cellular stress (Pungartnik et al., 2002; Akhter et al., 2004; Cattell et al., 2010; Yan et al., 2010). Indeed, SNM1 gene family has a clear role in the maintenance of genomic integrity and in the suppression of tumorigenesis (for more information, see ‘Protein interactions’ in Table 1).

Microhomology-mediated End Joining: An Alternative Pathway for DSB Repair and its Relation to Pso2 Protein

DSBs arise as normal consequences of cell division and differentiation (Guirouilh-Barbat et al., 2007) and consist of essential intermediates during programmed recombination events, such as meiosis, budding yeast mating-type interconversion, and lymphocyte development (Krogh and Symington, 2004; Soulas-Sprauel et al., 2007). Consequently, the repair of chromosome breaks is essential to maintain genome integrity (Haber, 2008). DSBs may also originate from the resolution of replication forks stalled near an ICL induced by bifunctional chemotherapeutic drugs (Lehoczký et al., 2007).

Cells use two major pathways to faithfully repair DSBs, namely HR and canonical NHEJ (referred in this review as NHEJ). NHEJ is Ku-dependent and, in addition to the YKu heterodimer (YKu70-YKu80), it also involves, in yeast, Lig4 associated with its cofactors Lif1 and Nej1 (Lees-Miller, 2003). In mammals, the complex DNA-PKcs-Artemis is also required (Niewolik et al., 2006). During NHEJ, annealing of fully complementary single-stranded ends can result in accurate repair. However, most breaks created during cellular metabolism do not possess complementary ends and NHEJ frequently proceeds through annealing of short microhomologous sequences, and subsequent processing of DNA ends leads to small (1-4 nt) deletions and insertions in repair products (McVey and Lee, 2008).

Recently, a repair mechanism that is Ku-independent has received increasing attention, namely microhomology-mediated end joining (MMEJ). One of the first demonstration of MMEJ was reported from assays investigating repair of restriction-enzyme-linearized plasmids that were transformed into YKu80-deficient *S. cerevisiae* (Boulton and Jackson, 1996). Subsequent studies with mammalian cell model systems supplied the first genetic evidence that this repair mechanism was distinct from NHEJ (Kabotyanski et al., 1998; Verkaik et al., 2002; Guirouilh-Barbat et al., 2004). The large number of approaches used to study this mechanism in the last 5 years has led to the use of different terms to describe it, like alternative NHEJ (A-NHEJ), Ku-independent end-joining, and backup NHEJ (B-NHEJ) (Ma et al., 2003; Corneo et al., 2007; Haber, 2008; Wu et al., 2008); however, we choose to use the nomenclature MMEJ that seems more widespread.

The foremost distinguishing property of MMEJ is the use of larger microhomology sequences (5-25 bp) during the alignment of broken ends before joining, thereby resulting in larger deletions flanking the original break. By this reason, MMEJ is also frequently associated with chromosome abnormalities such as deletions, translocations, inversions and other complex rearrangements (McVey and Lee, 2008). Accordingly, MMEJ may contribute to the chromosomal translocations that give rise to lymphoid cancers (Nussenzweig and Nussenzweig, 2007).

In *S. cerevisiae*, MMEJ becomes more efficient with blunt-ended breaks or incompatible overhangs, which are both poor NHEJ substrates (Boulton and Jackson, 1996; Zhang and Paull, 2005). In both budding and fission yeast, the Ku heterodimer inhibits MMEJ, while in *yku70* mutants accelerated single-stranded DNA formation accounts, in part, for increased MMEJ repair (Decottignies, 2007; Hart et al., 2007). In fact, deletion of YKu proteins in *S. cerevisiae* allows more robust 5'-3' resection of the ends that is a necessary step to expose regions with approximately 10-bp microhomologies (Haber, 2008). This is in accordance with previous results of our group for survival of *S. cerevisiae* mutant *yku70* Δ (Munari et al., 2012), which exhibited low sensitivity to treatment with photoactivated 8-methoxypsoralen (8-MOP+UVA). However, the double mutation *pso2* Δ *yku70* Δ yielded a double mutant highly sensitive to the bifunctional psoralen. Thus, it is possible to conclude that *PSO2* gene is necessary for ICL repair in the absence of *YKU70*. Considering the ability of Pso2 nuclease to process complex DNA-

ends (e.g. hairpins), it is likely that Pso2p plays a role in providing substrate for MMEJ pathway. Another important aspect that supports this hypothesis is that *pso2* mutant is blocked for induced mutagenesis following treatment with cross-linking agents (Cassier et al, 1980; Henriques and Brendel, 1990), i.e. mutations induced by the error-prone repair mechanism of MMEJ are impaired.

Studies on the characterization of MMEJ showed that the proteins Mre11, Nej1, Srs2, Sae2 and Tel1 are involved in either the mechanics or regulation of MMEJ in *S. cerevisiae*. Also, Rad1–Rad10 structure-specific endonuclease has a key role in MMEJ by cleaving 3' flaps from an annealed intermediate (Ma et al., 2003; Lee and Lee, 2007). The presence of inserted nucleotides at many MMEJ junctions indicates that error-prone polymerases are frequently involved in the processing stages of repair. Indeed, translesion DNA polymerases Polη and Polζ participate in MMEJ in *S. cerevisiae*, and deletion of POL32, a nonessential Polδ subunit, causes severe decrease in MMEJ repair frequency (Lee and Lee 2007). Finally, ligation of annealed and fully processed joints is achieved by DNA Ligase I and Ligase IV (McVey and Lee, 2008).

The Fanconi Anemia Pathway is Functionally Conserved in *S. cerevisiae*: a Partner and an Alternative for ICL Repair

The Fanconi anemia (FA) DNA repair pathway is a major regulator of human ICL repair, and was named based on FA patients, which have mutations in one of the fifteen FA or FA-like proteins. FA consists of an inherited human disorder, which is characterized by extreme sensitivity to ICL forming agents and genomic instability, leading to developmental defects and cancer predisposition (Auerbach, 2009; Muniandy et al., 2010). Like human FA cells, yeast *pso2* mutants are highly sensitive to ICLs, but not to other forms of DNA damage (Henriques and Moustacchi, 1980; Ruhland et al., 1981). Until recently, FA was believed to be a DNA repair pathway restricted to vertebrates.

FANCM is one of the few FA proteins with clear, evolutionarily conserved orthologs in lower organisms - Mph1 in *S. cerevisiae*, Fml1 in *Schizosaccharomyces pombe*, and Hef in *Archaeobacteria* (Meetei et al., 2005; Wang, 2007; Sun et al., 2008). In both yeast and mammalian pathways, Mph1/FANCM-mediated fork regression or stabilization of DNA replication machinery stalled at the ICL is a key step in FA pathway

(Dae et al., 2012). Interestingly, yeast cells disrupted for *MPH1* alone are not sensitive to ICLs, in contrast to vertebrate *fancm* mutants; however, co-disruption with *PSO2* gene revealed an important role for Mph1 protein in ICL repair (Meetei et al., 2005; Ward et al., 2012).

Recently, an ICL repair pathway conserved throughout evolution in yeasts has been characterized that besides Mph1 protein, is composed by Chl1, Mhf1 and Mhf2 (FANCI, MHF1 and MHF2 homologs, respectively) (Dae et al., 2012). This pathway is epistatic with Rad5-mediated DNA damage bypass and distinct from the ICL repair pathways mediated by Rad18p and Pso2p (Dae et al., 2012). In the model proposed by the authors, Rad5p responds to the ICL-stalled replication fork, ubiquitinates PCNA and recruits Mph1, which in turn interacts with Mhf1 and Mhf2 to stabilize at ICL damage sites and reverse the fork, thus protecting the intermediates during repair (Yan et al., 2010; Singh et al., 2011) and preventing ICL-stalled replication forks from collapsing into DSBs (Dae et al., 2012). When Pso2p is present, its endonuclease activity likely cleaves ICL repair intermediates (Wilborn and Brendel, 1989; Ma et al., 2002; Tiefenbach and Junop, 2012), with a possible involvement of the Sak1 kinase, as proposed by experiments of our group (Munari et al., 2012). Next, HR proteins, including Rad52 and Rad51, fill in gaps post-incision and/or repair DSBs that arise during ICL repair (Symington, 2002; Hinz, 2010).

In addition, it has demonstrated that Mph1 physically and functionally interacts with Mgm101, a protein previously implicated in mitochondrial DNA repair, and the MutS α mismatch repair factor (Msh2-Msh6) (Ward et al., 2012). Co-disruption of *MPH1*, *MGM101*, *MSH2*, or *MSH6* with *PSO2* gene produces a lesion-specific increase in ICL sensitivity, the elevation of ICL-induced chromosomal rearrangements, and persistence of ICL-associated DSBs. The authors propose that Mph1-Mgm101-MutS α directs the ICL-induced recruitment of Exo1 to chromatin, placing Exo1 as an alternative 5'-exonuclease utilized for ICL repair in the absence of Pso2 (Ward et al., 2012). The authors propose that ICL repair in exponential growing *S. cerevisiae* cells has overlapping or redundant participation of Pso2 and FA-like pathways with a major contribution of the former. In the case of *pso2* cells, FA-like pathway constitutes an alternative for ICL repair, preventing replication forks from collapsing into DSBs and stabilizing the generated ICL repair intermediate structure. In the absence of both Pso2 and FA pathways, replication forks

collapse into unreparable DSBs upon ICL treatment leading to cell death (McHugh et al., 2012).

Taken together, these studies suggest that a prototypical FA-related ICL repair pathway operates in budding yeast, which acts redundantly with the pathway controlled by Pso2, and is required for the targeting of Exo1 nuclease to chromatin to execute ICL repair (Ward et al., 2012; McHugh et al., 2012).

Concluding Remarks

S. cerevisiae played an important role in the initial studies to identify genes involved in the complex process of DNA repair. As can be seen from the studies conducted over the last four decades, this simple eukaryote still represent a model that encloses great potential to help unravel the mechanisms of repair and tolerance to DNA damage, generating a knowledge which serves as the starting point to advance in the study of more complex models.

When MMEJ was initially characterized, it seemed to be a repair option that was used only when the canonical NHEJ pathway was impaired. However, recent investigations reported here have demonstrated that MMEJ can operate even in the context of intact NHEJ and HR repair. This realization, combined with observations that MMEJ repair is often associated with genomic instability and cancer, prompted systematic studies that have begun to define its genetic underpinnings (McVey and Lee, 2008). Many features concerning the mechanism and purpose of MMEJ have yet to be clarified, and special attention should be given to the fact that not every alternative end-joining event is MMEJ and certain alternative end-joining events are clearly distinct from MMEJ, probably representing another end-joining pathway waiting to be defined (McVey and Lee, 2008).

Taking into account the studies referred here, it is not an overstatement to wonder that interesting connections exist between MMEJ, DNA interstrand crosslink repair pathways and the Fanconi anemia (FA) genes. Intriguingly, certain FA cell lines are deficient in DNA-PKcs-independent plasmid joining involving microhomologies, consistent with a role for FA genes in MMEJ (McVey and Lee, 2008). In addition, two Chinese hamster ovary cell lines that are sensitive to the crosslinking agent mitomycin C also demonstrate reduced MMEJ-mediated DSB repair (Verkaik et al., 2002). Additional

investigations into components that might be shared by both MMEJ and ICL repair pathways could provide new insights into the mechanisms and regulation of both. The results recently obtained by different groups validate the yeast model for future studies of the FA repair pathway and suggest that other functional FA homologs likely exist (Dae et al., 2012; McHugh et al., 2012).

Acknowledgements

FMM held fellowship of CAPES. This work was supported by, PRONEX/FAPERGS/CNPq 10/004-3 and Genotox-Royal Insitute.

References

- Akhter, S., Lam, Y.C., Chang, S., Legerski, R J, 2010. The telomeric protein SNM1B/Apollo is required for normal cell proliferation and embryonic development. *Aging Cell* 9, 1047–56.
- Akhter, S., Richie, C.T., Deng, J.M., et al., 2004. Deficiency in SNM1 Abolishes an Early Mitotic Checkpoint Induced by Spindle Stress. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10448–10455.
- Auerbach, A.D., 2009. Fanconi Anemia and its Diagnosis. *Mutat. Res.* 668, 4–10.
- Bae, J.-B., Mukhopadhyay, S.S., Liu, L., et al., 2008. Snm1B/Apollo Mediates Replication Fork Collapse and S Phase Checkpoint Activation in Response to DNA Interstrand Cross- Links. *Oncogene* 27, 5045–5056.
- Barber, L.J., Ward, T A, Hartley, J A, McHugh, P J, 2005. DNA Interstrand Cross-Link Repair in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle : Overlapping Roles for PSO2 (SNM1) with MutS Factors and EXO1 during S Phase. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2297–2309.
- Bauer, G.B., Povirk, L.F., 1997. Specificity and kinetics of interstrand and intrastrand bifunctional alkylation by nitrogen mustards at a G-G-C sequence. *Nucleic Acids Res.* 25, 1211–8.
- Bonato, D., Revers, L.F., et al., 2005. The eukaryotic Pso2/Snm1/Artemis proteins and their function as genomic and cellular caretakers. *Braz J Med Biol Res*, 38:321–334.
- Bonato, D., Brendel, M, Henriques, J A P, 2005a. A new group of plant-specific ATP-dependent DNA ligases identified by protein phylogeny, hydrophobic cluster analysis and 3-dimensional modelling. *Funct. Plant Biol.* 32, 161–174.

- Bonatto, D., Brendel, M, Henriques, J A P, 2005b. The eukaryotic Pso2p/Snm1p family revisited: in silico analyses of Pso2p A, B and Plasmodium groups. *Comput. Biol. Chem.* 29, 420–433.
- Boulton, S.J., Jackson, S P, 1996. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res.* 24, 4639–48.
- Brendel, M., Marisco, G., Ganda, I., et al., 2010. DNA repair mutant *pso2* of *Saccharomyces cerevisiae* is sensitive to intracellular acetaldehyde accumulated by disulfiram-mediated inhibition of acetaldehyde dehydrogenase. *Genet Mol Res.* 9, 48-57.
- Brendel, M, Bonatto, D., Strauss, et al., 2003. Role of PSO genes in repair of DNA damage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 544, 179–193.
- Brendel, M, Henriques, J A P, 2001. The *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. *Mutat. Res.* 489, 79–96.
- Callebaut, I, Moshous, D, Mornon, J.-P., De Villartay, J-P, 2002. Metallo-beta-lactamase fold within nucleic acids processing enzymes: the beta-CASP family. *Nucleic Acids Res.* 30, 3592–601.
- Cassier-Chauvat, C., Moustacchi, E., 1988. Allelism between *pso1-1* and *rev3-1* mutants and between *pso2-1* and *snm1* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 13, 37–40.
- Cassier, C., Chanet, R., Henriques, J. A. P., Moustacchi, E., 1980. The effects of three *PSO* genes on induced mutagenesis: A Novel class of mutationally defective yeast. *Genetics* 96, 841–857.
- Cattell, E., Sengerová, B., McHugh, P. J, 2010. The SNM1/Pso2 Family of ICL Repair Nucleases: From Yeast to Man. *Environ Mol. Mutag.* 51, 635–645.
- Cole, R.S., 1973. Repair of DNA Containing Interstrand Crosslinks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 1064–1068.
- Corneo, B., Wendland, R.L., Deriano, L., et al., 2007. Rag mutations reveal robust alternative end joining. *Nature* 449, 483–486.
- Cruz, L. A., 2012 Estudo da interação entre remodeladores de cromatina e vias de reparação de DNA em resposta ao dano induzido por agentes antineoplásicos e ditelureto de difenila em *Saccharomyces cerevisiae*. PhD Thesis, UFRGS, Porto Alegre, RS. Brazil.
- Dae, D. L, Ferrari, E., Longerich, S., et al., 2012. Rad5-dependent DNA repair functions of the *Saccharomyces cerevisiae* FANCM protein homolog Mph1. *J. Biol. Chem.* 287, 26563–26575.

- Decottignies, A., 2007. Microhomology-mediated end joining in fission yeast is repressed by *pku70* and relies on genes involved in homologous recombination. *Genetics* 176, 1403–1415.
- Degrandi, T.H., De Oliveira, I.M., d' Almeida, G.S., et al., 2010. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. *Mutagenesis* 25, 257–269.
- Demuth, I., Digweed, M., Concannon, P., 2004. Human SNM1B is required for normal cellular response to both DNA interstrand crosslink-inducing agents and ionizing radiation. *Oncogene* 23, 8611–8618.
- Dominski, Z., 2007. Nucleases of the Metallo- β -lactamase Family and their Role in DNA and RNA metabolism. *Crit. Rev. Biochem.Mol. Biol.* 42, 67–93.
- Dronkert, M.L.G., Kanaar, R., 2001. Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat. Res.* 486, 217–247.
- Dronkert, L.M., De Wit, J., Boeve, M., et al., 2000. Disruption of mouse SNM1 causes increased sensitivity to the DNA interstrand cross-linking agent mitomycin C. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4553–4561.
- Dudás, A., Vlasáková, D, Dudásová, Z., et al., 2007. Further characterization of the role of Pso2 in the repair of DNA interstrand cross-link-associated double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Neoplasma* 54, 189–194.
- Engman, L., Kandra, T., Gallegos, A., et al., 2000. Water-soluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells. *Anticancer Drug Design* 15, 323–330.
- Grossmann, K.F., Ward, A.M., Matkovic, M.E., et al., 2001. *S. cerevisiae* has three pathways for DNA interstrand crosslink repair. *Mut. Res.* 487, 73–83.
- Guirouilh-Barbat, J., Rass, E., Plo, I., Bertrand, P., Lopez, B.S., 2007. Defects in *XRCC4* and *KU80* differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20902–20907.
- Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., et al., 2004. Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol. Cell* 14, 611–23.
- Haber, J.E., 2008. Alternative endings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 405–406.
- Hart, G.T., Lee, I., Marcotte, E.R., 2007. A high-accuracy consensus map of yeast protein complexes reveals modular nature of gene essentiality. *BMC Bioinformatics* 8, 236.
- Hejna, J, Philip, S., Ott, J., Faulkner, C., Moses, R., 2007. The hSNM1 protein is a DNA 5'-exonuclease. *Nucleic Acids Res.* 35, 6115 – 6123.
- Hemphill, A.W., Bruun, D., Thrun, L., et al., 2008. Mammalian SNM1 is required for genome stability. *Mol. Gen. Metabolism* 94, 38–45.

- Henriques, J. A. P., Brozmanova, J., Brendel, M., 1997. Role of *PSO* genes in the repair of photoinduced interstrand cross-links and photooxidative damage in the DNA of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Photochem. Photobiol. B* 39, 185–196.
- Henriques, J. A. P., Brendel, M., 1990. The role of *PSO* and *SNM* genes in DNA repair of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 18, 387–393.
- Henriques, J. A. P., Moustacchi, E., 1981. Interactions between mutations for sensitivity to psoralen photoaddition (*pso*) and to radiation (*rad*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 148, 248–56.
- Henriques, J. A. P., Moustacchi, E., 1980. Isolation and characterization of *pso* mutants sensitive to photo-addition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 95, 273–88.
- Hinz, J.M., 2010. Role of Homologous Recombination in DNA Interstrand Crosslink Repair. *Environ. Mol. Mutag.* 51, 582–603.
- Ho, T.V., Guainazzi, Angelo, Derkunt, S.B., Enoiu, M., Schärer, Orlando D, 2011. Structure-dependent bypass of DNA interstrand crosslinks by translesion synthesis polymerases. *Nucleic Acids Res.* 39, 7455–64.
- Ho, T. V, Schärer, O D, 2010. Translesion DNA Synthesis Polymerase in DNA Interstrand Crosslink Repair. *Environ. Mol. Mutag.* 51, 552–566.
- Ishiai, M., Kimura, M., Namikoshi, K., et al., 2004. DNA Cross-Link Repair Protein SNM1A Interacts with PIAS1 in Nuclear Focus Formation. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10733–10741.
- Jenny A, Minvielle-Sebastia L, Preker PJ, K.W., 1996. Sequence similarity between the 73-kilodalton protein of mammalian CPSF and a subunit of yeast polyadenylation factor I. *Science* 274, 1514–1517.
- Kabotyanski, E.B., Gomelsky, L., Han, J., Stamato, T.D., Roth, D.B., 1998. Double-strand break repair in Ku86- and XRCC4-deficient cells. *Nucleic Acids Res.* 26, 5333–5342.
- Krogh, Berit Olsen, Symington, Lorraine S, 2004. Recombination proteins in yeast. *Annu. Rev. Genet.* 38, 233–271.
- Lam, A.F., Krogh, B O, Symington, L S, 2008. Unique and overlapping functions of the Exo1, Mre11 and Pso2 nucleases in DNA repair. *DNA Repair* 7, 655–662.
- Lee, K., Lee, Sang Eun, 2007. *Saccharomyces cerevisiae* Sae2- and Tel1-dependent single-strand DNA formation at DNA break promotes microhomology-mediated end joining. *Genetics* 176, 2003–2014.
- Lees-Miller, S., 2003. Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* 85, 1161–1173.
- Lehoczký, P., McHugh, P J, Chovanec, M, 2007. DNA interstrand cross-link repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 109–133.

- Lenain, C., Bauwens, S., Amiard, S., Brunori, M., Giraud-Panis, M.-J., Gilson, E., 2006. The Apollo 52 Exonuclease Functions Together with TRF2 to Protect Telomeres from DNA Repair. *Curr. Biol.* 16, 1303–1310.
- Li, X; Hejna, J.; Moses, R.E., 2005. The yeast Snm1 protein is a DNA 5'-exonuclease. *DNA Repair* 4, 163–170.
- Li, X, Moses, R.E., 2003. The beta-lactamase motif in Snm1 is required for repair of DNA double-strand breaks caused by interstrand crosslinks in *S. cerevisiae*. *DNA Repair* 2, 121–129.
- Liu, L., Akhter, S., Bae, J.B., 2009. SNM1B/Apollo interacts with astrin and is required for the prophase cell cycle checkpoint. *Cell Cycle* 8, 628–638.
- Ma, Y., Pannicke, U., Lu, H., et al., 2005. The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit phosphorylation sites in human Artemis. *J. Biol. Chem.* 280, 33839–338346.
- Ma, J., Kim, E.M., Haber, J.E., Lee, Sang Eun, 2003. Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8820–8828.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., Lieber, M. R., 2002. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108, 781–794.
- Magaña-Schwencke, N., Henriques, J. A. P., Chanet, R., Moustacchi, E., 1982. The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced crosslinks in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair-deficient strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 1722–1726.
- Mason, J.M., Sekiguchi, J.M., 2011. Snm1B/Apollo functions in the Fanconi anemia pathway in response to DNA interstrand crosslinks. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2549–2559.
- McHugh, Peter J, Ward, T A, Chovanec, M, 2012. A prototypical Fanconi anemia pathway in lower eukaryotes? *Cell Cycle* 11, 3739–44.
- McHugh, P J, Spanswick, V J, Hartley, J A, 2001. Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *The Lancet Oncology* 2, 483–90.
- McHugh, P J, Sones, W.R., Hartley, J A, 2000. Repair of intermediate structures produced at DNA interstrand cross-links in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3425–3433.
- McVey, M., 2010. Insights from worms, flies, frogs, and slime molds. *Environ. Mol. Mutag.* 51, 646–658.
- McVey, M., Lee, S. E., 2008. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet.* 24, 529–538.

- Meetei, A.R., Medhurst, A.L., Ling, et al., 2005. A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nature Genet.* 37, 958–963.
- Moshous, D., Callebaut, I., De Chasseval, et al., 2001. Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* 105, 177–186.
- Munari, F. M., Revers, L. F. R., Cardone, J. M., et al. Sak1 kinase interacts with Pso2 nuclease in response to DNA damage induced by interstrand crosslink-inducing agents in *Saccharomyces cerevisiae*, 2012. *J. Photochem. Photobiol. B*, submitted.
- Muniandy, P., Liu, J., Majumdar, A., et al., 2010. DNA interstrand cross-link repair in mammalian cells. Step by step. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 45, 23–49.
- Niedernhofer, L. J., Daniels, J. S., Rouzer, et al., 2003. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J. Biol. Chem.* 278, 31426–31433.
- Niewolik, D., Pannicke, U., Lu, H., et al., 2006. DNA-PKcs dependence of Artemis endonucleolytic activity, differences between hairpins and 5' or 3' overhangs. *The J Biol. Chem.* 281, 33900–33909.
- Noll, D.M., Mason, T.M., Miller, P.S., 2006. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chem. Rev.* 106, 277–301.
- Nussenzweig, A., Nussenzweig, M.C., 2007. A backup DNA repair pathway moves to the forefront. *Cell* 131, 2006–2008.
- Pannicke, U., Ma, Y., Hopfner, K.-P., et al., 2004. Functional and biochemical dissection of the structure-specific nuclease ARTEMIS. *EMBO Journal* 23, 1987–97.
- Poinsignon, C., Moshous, D., Callebaut, I., et al., 2004. The metallo-beta-lactamase/beta-CASP domain of Artemis constitutes the catalytic core for V(D)J recombination. *J. Exp. Med.* 199, 315–21.
- Pungartnik, C., Picada, J., Brendel, M, Henriques, J.A., 2002. Further phenotypic characterization of *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with respect to DNA repair and response to oxidative stress. *Genet. Mol. Res.* 1, 79–89.
- Riballo, E., Kühne, M., Rief, N., et al., 2004. A Pathway of Double-Strand Break Rejoining Dependent upon ATM, Artemis, and Proteins Locating to γ -H2AX Foci. *Mol. Cell* 16, 715–24.
- Rooney, S., Sekiguchi, J., Whitlow, S., et al., 2004. Artemis and p53 cooperate to suppress oncogenic N-myc amplification in progenitor B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2410–2415.
- Rooney, S., Alt, F. W., Lombard, D., et al., 2003. Defective DNA repair and increased genomic instability in Artemis-deficient murine cells. *J. Exp. Med.* 197, 553–565.

- Ruhland, A., Haase, E., Siede, W., Brendel, M, 1981. Isolation of yeast mutants sensitive to the bifunctional alkylating agent nitrogen mustard. *Mol. Gen. Genet.* 181, 346–351.
- Saffi, J, Feldmann, H., Winnacker, E.L., Henriques, J A P, 2001. Interaction of the yeast Pso5/Rad16 and Sgs1 proteins: influences on DNA repair and aging. *Mutat. Res.* 486, 195–206.
- Sarkar, S., Davies, A. a, Ulrich, H.D., McHugh, Peter J, 2006. DNA interstrand crosslink repair during G1 involves nucleotide excision repair and DNA polymerase zeta. *EMBO J.* 25, 1285–94.
- Schärer, O D, 2005. DNA interstrand crosslinks: natural and drug-induced DNA adducts that induce unique cellular responses. *ChemBioChem* 6, 27–32.
- Shen, X, Li, L, 2010. Mutagenic Repair of DNA Interstrand Crosslinks. *Environ. Mol. Mutag.* 51, 493–499.
- Singh, T.R., Saro, D., Ali, A.M., et al., 2011. MHF1-MHF2, a Histone-Fold-Containing Protein Complex, Participates in the Fanconi Anemia Pathway via FANCM. *Mol. Cell* 37, 879–886.
- Soulas-Sprauel, P., Guyader, G. L., Rivera-Munoz, P., et al., 2007. Role for DNA repair factor XRCC4 in immunoglobulin class switch recombination. *JEM* 204, 1717–1727.
- Sun, W., Nandi, S., Osman, et al., 2008. The FANCM ortholog Fml1 promotes recombination at stalled replication forks and limits crossing over during DNA double-strand break repair. *Mol. Cell* 32, 118–128.
- Symington, Lorraine S, Gautier, J., 2011. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual Rev. Genet.* 45, 247–71.
- Symington, L S, 2002. Role of RAD52 Epistasis Group Genes in Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 630–670.
- Takaku, H., 2003. A candidate prostate cancer susceptibility gene encodes tRNA 3' processing endoribonuclease. *Nucleic Acids Res.* 31, 2272–2278.
- Tiefenbach, T., Junop, M., 2012. Pso2 (SNM1) is a DNA structure-specific endonuclease. *Nucleic Acids Res.* 40, 2131–2139.
- Touzot, F., Callebaut, I., Soulier, J., et al., 2010. Function of Apollo (SNM1B) at telomere highlighted by a splice variant identified in a patient with Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 10097–102.
- Van Overbeek, M., De Lange, T., 2006. Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase. *Curr. Biol.* 16, 1295–1302.
- Verkaik, N.S., Esveldt-van Lange, R.E.E., Van Heemst, D., et al., 2002. Different types of V(D)J recombination and end-joining defects in DNA double-strand break repair mutant mammalian cells. *Eur. J. Immunol.* 32, 701–9.

- Wang, A.T., Sengerová, B., Cattell, E., et al., 2011. Human SNM1A and XPF – ERCC1 collaborate to initiate DNA interstrand cross-link repair. *Genes Develop.* 25, 1859–1870.
- Wang, W., 2007. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nature Rev. Genet.* 8, 735–748.
- Ward, T. A., Dudášová, Z., Sarkar, S., et al, 2012. Components of a Fanconi-like pathway control Pso2-independent DNA interstrand crosslink repair in yeast. *PLoS Genetics* 8, e1002884.
- Wilborn, F., Brendel, M, 1989. Formation and stability of interstrand cross-links induced by *cis*-diamminedichloroplatinum and *trans*-diamminedichloroplatinum (II) in the DNA of *Saccharomyces cerevisiae* strains differing in repair capacity. *Curr. Genet.* 16, 331–338.
- Wood, R.D., 2010. Mammalian Nucleotide Excision Repair Proteins and Interstrand Crosslink Repair. *Environ. Mol. Mutagen.* 51, 520–526.
- Wu, W., Wang, M., Singh, S.K., Mussfeldt, T., Iliakis, G., 2008. Repair of radiation induced DNA double strand breaks by backup NHEJ is enhanced in G2. *DNA Repair (Amst)* 7, 329–338.
- Yan, Y., Zhang, X., Legerski, R. J., 2011. Artemis interacts with the Cul4A-DDB1(DDB2) ubiquitin E3 ligase and regulates degradation of the CDK inhibitor p27. *Cell Cycle* 10, 4098 – 4109.
- Yan, Y., Akhter, S, Zhang, X, Legerski, R., 2010. The multifunctional SNM1 gene family: not just nucleases. *Future Oncology* 6, 1015–1029.
- Zhang, Xiaoming, Paull, T.T., 2005. The Mre11/Rad50/Xrs2 complex and non homologous end-joining of incompatible ends in *S. cerevisiae*. *DNA Repair* 4, 1281–1294.

Table 1. Mammalian homologs that act on DNA for Pso2 protein of *Saccharomyces cerevisiae*.

	Yeast	Mammalian		
	Pso2p	SNM1A	SNM1B (Apollo)	SNM1C (Artemis)
Activity	5'-exonuclease (Li et al., 2005), independent of DNA structure, but dependent on the presence of a 5'-phosphate (Tiefenbach and Junop, 2012); endonuclease, specific for DNA hairpin structures (Tiefenbach and Junop, 2012)	5'-exonuclease, preference towards ss-DNA (Hejna et al., 2007); presents the highest sequence similarity (39%) to yeast Pso2 (Dronkert et al., 2000; Ishiai et al., 2004)	5'-exonuclease, low substrate preference (Lenain et al., 2006); presents 33% similarity with yeast Pso2 (Demuth et al., 2004)	endonuclease, cleaves 5' and 3' overhangs and hairpins (Ma et al., 2002; Rooney et al., 2003); possesses a C-terminal domain that is highly phosphorylated by DNA-PKcs (Ma et al., 2005); the purified protein alone possesses intrinsic 5'-exonuclease activity, specific for ss-DNA (Ma et al., 2002; Pannicke et al., 2004)
Function	required for a post-incision step in ICL repair ; however, a late step in crosslink repair that is required for restoration of high molecular weight DNA after the initial repair processes appeared to be defective (Brendel et al., 2003; Magaña-Schwencke et al., 1982; Wilborn and Brendel, 1989)	suppresses ICL-induced DSBs during replication (Demuth et al., 2004; Wang et al., 2011); collaborates with XPF-ERCC1 in initiating ICL repair in replicating cells (Wang et al., 2011); required for checkpoint mediated cell cycle arrest in early prophase in response to mitotic spindle poisons (Akhter et al., 2004)	acts prior to incision, facilitating DSB formation in response to ICLs (Bae et al., 2008); in case of spindle stress, involved in prophase checkpoint cell cycle (Van Overbeek and De Lange, 2006; Akhter et al. 2010); plays a central role in telomere maintenance and protection during S-phase (Van Overbeek and De Lange, 2006)	probably does not play a major role in ICL repair; acts in a subset of DNA DSBs induced by IR (Riballo et al., 2004) and in V(D)J recombination, prior to rejoining by NHEJ (Moshous et al., 2001); activation of C-term. domain by phosphorylation is necessary only for V(D)J recombination, but not for DSBs repair (Poinsignon et al., 2004); removal of the C-term. domain results in constitutive activation of the endonuclease activity (Niewolik et al., 2006)

Mutant/depletion phenotype	<p>sensitivity to ICL-inducing agents, e.g., psoralen + UVA, cyclophosphamide, cisplatin, mitomycin C, oxaliplatin (Henriques and Moustacchi, 1980 and 1981; Ruhland et al., 1981);</p> <p>low mutability, only for ICL-inducing mutagens (Cassier et al., 1980; Henriques and Moustacchi, 1980; Saffi et al., 2001)</p>	<p>depletion increases sensitivity to ICL-inducing agents in mouse, chicken, and human (Dronkert et al., 2000; Ishiai et al., 2004);</p> <p>chromosomal instability (Hemphill et al., 2008)</p>	<p>sensitivity to various ICL-inducing agents (Demuth et al., 2004);</p> <p>accumulation of DNA damage response factor at telomere ends (S phase) (Van Overbeek and De Lange, 2006);</p> <p>chromosomes end-to-end fusions in knockout mice (Lenain et al., 2006);</p> <p>may cause Hoyeraal-Hreidarsson syndrome in males, characterized by aplastic anemia and immunodeficiency among other symptoms (Touzot et al., 2010)</p>	<p>patients lacking functional Artemis develop radiosensitive severe combined immunodeficiency (RS-SCID) (Moshous et al., 2001);</p> <p>chicken cells Artemis-deficient exhibited sensitivity to X-rays but not to cisplatin (Ishiai et al., 2004)</p>
Protein interactions ^(a)	<p>nonepistatic with <i>RAD52</i> (in stationary phase) (Henriques and Moustacchi, 1981), <i>RAD50</i> and <i>MRE11</i> genes (Munari et al, 2012);</p> <p>epistatic with <i>RAD3</i> (NER) (Henriques and Moustacchi, 1981), <i>REV3/PSO1</i> (TLS repair) (Henriques et al., 1997; Barber et al., 2005), <i>SAK1</i> (Munari et al, 2012) and <i>XRS2</i> (MRX complex) genes (^b unpublished data)</p>	<p>interacts with PIAS1, and they colocalize at nuclear foci, whit overlap with those formed by the MRN complex and BRCA1 (Ishiai et al., 2004);</p> <p>interacts with Astrin, a mitotic-spindle-associated protein (Yan et al., 2010);</p> <p>nonepistatic with XRCC3 (HR), <i>RAD18</i> (TLS), FANCC (FA pathway), and SNM1B in ICL repair (Ishiai et al., 2004);</p>	<p>recruited to telomeres via its interaction with TRF2 (Demuth et al., 2004);</p> <p>acts epistatically with the central FA factor FANCD indicating that it functions within the FA pathway during ICL repair (Cole, 1973; Mason and Sekiguchi, 2011);</p> <p>interacts with the MRN complex and with the nuclease heterodimer MUS81-EME1 (Liu et al., 2009);</p> <p>interacts with Astrin, and is required for a prophase cell cycle checkpoint (Liu et al., 2009)</p>	<p>interacts with the Cul4A–DDB1 ubiquitin ligase complex, consisting of a novel pathway for the regulation of p27 in mammals (Yan et al., 2011);</p> <p>acts as a tumor suppressor in mice knockout for p53 (Rooney et al., 2004)</p>

^(a) The definitions of the genetic terms used are: *epistasis*, a genetic interaction that suggests that two proteins work in the same pathway due to a common, non-additive phenotype; *synergistic*, a complex genetic interaction where the combined phenotype is more than additive, suggesting that the pathways

can compensate for one another; *additive*, a genetic interaction where the expressed phenotype reflects the sum of the two independent phenotypes.

^(b) Please see *Supplementary results* on Chapter 3.

Capítulo II

Sak1 kinase contributes to Pso2 nuclease in repair of DNA damage induced by interstrand crosslink-inducing agents in *Saccharomyces cerevisiae*

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology (submetido para publicação)

Sak1 kinase contributes to Pso2 nuclease in repair of DNA damage induced by interstrand crosslink-inducing agents in *Saccharomyces cerevisiae*

Fernanda M. Munari ^{a,1}, Luis F. Revers ^{a,1,2}, Jacqueline M. Cardone ^{a,3}, Bruna F. Immich ^{a,d}, Dinara J. Moura ^d, Temenouga N. Guecheva ^{a,b}, Diego Bonatto ^a, Jenifer Saffi ^d, Martin Brendel ^c, João A. P. Henriques ^{a,b,e} *

^a Biotechnology Center, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 91507-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Department of Biophysics, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 91507-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Department of Biological Sciences, State University of Santa Cruz (UESC), 45662-900, Ilhéus, BA, Brazil

^d Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

^e Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul (UCS), 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil

* Corresponding author:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Centro de Biotecnologia

Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43421, Campus do Vale

Caixa Postal 15005

91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

Tel.: + 55 51 3308 6069

Fax: +55 51 3308 6084

E-mail address: pegas@cbiot.ufrgs.br (J.A.P. Henriques)

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Present address: EMBRAPA, National Research Center of Grape and Wine, 95700-000, Bento Gonçalves, RS, Brazil

³ Present address: Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract

By isolating putative binding partners through the two-hybrid system (THS) we further extended the characterization of the specific interstrand cross-link repair gene *PSO2* of *Saccharomyces cerevisiae*. Nine fusion protein products were isolated for Pso2p using THS, among them the Sak1 kinase, which interacted with the C-terminal β -CASP domain of Pso2p. Comparison of mutagen-sensitivity phenotypes of *pso2* Δ , *sak1* Δ and *pso2* Δ *sak1* Δ disruptants revealed that *SAK1* is necessary for complete WT-like repair. The epistatic interaction of both mutant alleles suggests that Sak1p and Pso2p act in the same pathway of controlling sensitivity to DNA-damaging agents. We also observed that Pso2p is phosphorylated by Sak1 kinase *in vitro*. The survival data after exposition of *pso2* Δ , *yku70* Δ and *pso2* Δ *yku70* Δ for HN2 and *PSO2*, *SAK1* and *YKU70* single-, double- and triple mutants to 8-MOP+UVA indicated that ICL repair is independent of YKu70p in *S. cerevisiae*. Furthermore, a non-epistatic interaction was observed between *MRE11*, *PSO2* and *SAK1* genes after 8-MOP+UVA photoaddition, indicating that their encoded proteins act on the same substrate, but in distinct pathways. Hence, yeast *SAK1* could be defined as a new *locus* involved in cellular response to DNA damage. We also propose a model for the function of Pso2p-Sak1p in repair of DNA-ICL in yeast.

Key words: DNA repair, interstrand cross-link, DNA hairpin, Two Hybrid System, *SAK1/PAK1*, *PSO2/SNMI*.

1. Introduction

DNA interstrand cross-links (ICLs) are extremely genotoxic lesions since they covalently link the two complementary DNA strands, thereby resulting in stalled transcription and DNA replication, and ultimately prevent segregation of chromosomes. ICLs can arise from reactions with endogenous chemicals, such as the lipid peroxidation product malondialdehyde, or from exposure to various clinical anti-tumor drugs (e.g., cisplatin, nitrosoureas, nitrogen mustards) and photo-therapy treatments (psoralen plus UVA light – PUVA therapy) [1,2]. The presence of one non-repaired ICL can be lethal in bacterial and yeast cells [1] and in mammalian cells 40 non-repaired ICLs induce cell death [3].

Yeast mutants cells hypersensitive to ICL-inducing agents were identified in the early 80s by two independent genetic screenings in *Saccharomyces cerevisiae*, which showed sensitivity to photoactivated **ps**oralen (*PSO2*) [4] and **s**ensitivity to **n**itrogen **m**ustard (*SNM1*) [5]. It was later demonstrated that these genes are allelic [6] and the nomenclature *PSO2* was adopted to unify them [1]. *pso2* yeast mutants have a unique feature, which is their hypersensitivity to photoactivated psoralen, bi- and polyfunctional alkylating compounds, while exhibiting only a wild-type (WT) level of sensitivity to monofunctional alkylating agents, ionizing radiation (IR), UVC light (254 nm) [7,8] and HO endonuclease [9].

The yeast gene *PSO2* encodes a 76 kDa nuclear protein that is believed to belong to a small group of proteins acting predominantly during ICL repair (for a review, see Brendel et al. 2003 [10]). Pso2 yeast protein has DNA 5'-exonuclease activity [11] and an endonuclease activity specific for DNA hairpin opening [12]. This nuclease activity is conferred by the metallo- β -lactamase hydrolase together with the β -CASP (metallo- β -lactamase-associated CPSF Artemis SNM1/PSO2) domain [13,14]. The β -CASP domain consists of a conserved region in the C-terminal moiety that is unique to the *PSO2* gene family and is predicted to be a nucleic acid binding domain [11,13,15–17]. The expression of yeast *PSO2* mRNA is constitutively low, with approximately 0.3 transcripts/cell [18], but is induced about four times by ICL-inducing agents in exponentially growing cells [19]. Over-expression of *PSO2* does not lead to an increased resistance to nitrogen mustard and cisplatin [20].

Five human orthologs for *PSO2* were identified: *SNM1A*, *SNM1B/Apollo*, and *SNM1C/Artemis* – which have roles in DNA metabolism and cell cycle regulation (reviewed by [14,21,22]; *CPSF73* and *ELAC2* – involved in RNA processing [15,21]. *SNM1Ap* is the functional mammal homolog of yeast Pso2p [23,24] and has roles in mediating resistance to some cross-linking drugs and in the maintenance of genome stability following ICL formation. *SNM1B/Apollo* protein possesses a 5'-exonuclease activity and plays a role in telomere maintenance [16]. *SNM1C/Artemis* alone also has 5'-exonuclease activity, while the Artemis:DNA-PK complex endonucleolytically cleaves 5' and 3' overhangs and has hairpin-opening activity [25], acting in V(D)J recombination and immune competence; its deficiency results in a severe combined immunodeficiency associated with increased cellular radio-sensitivity (RS-SCID) phenotype [26].

An intriguing aspect of ICL repair is that several DNA repair pathways have to work together in order to remove or bypass this lesion. In general terms, the pathways involved in ICL repair in *S. cerevisiae* are defined by homologous recombination (HR), translesion bypass synthesis (TLS) and nucleotide excision repair (NER) [8,9,27–29]. The involvement of Pso2 protein with these pathways still presents incompletely understood features. In yeast as in mammalian cells, cellular response to ICLs is cell cycle dependent [30]. The majority of ICLs are thought to be repaired during S phase, when the collapse of a replication fork encountering an ICL triggers the repair machinery [30,31]. Indeed, an ICL-stalled replication fork results in the formation of a double strand break (DSB) that represents a severe damage to the cell [32] and must be properly repaired. In G1 phase, the ICL can be recognized by a stalled RNA polymerase during transcription or by NER factors [33], and an ICL processing pathway that includes NER and TLS was shown to predominate during this phase of the yeast cell cycle [29].

It is well established that enzymes of nucleotide excision repair (NER) start processing ICL-containing DNA, but the repair process is post-incisionally blocked and DSBs are accumulated in absence of functional Pso2p, preventing the reconstitution of high molecular weight DNA in yeasts [34,35]. This points to a Pso2p function in ICL repair downstream of the incision event [9]. Moreover, the specific requirement for Pso2p in ICL repair suggests that DSBs formed during this process may be different from other forms of DNA breaks. Our bioinformatic analyses suggested Pso2p also to be a specific endonuclease related to the opening of hairpin structures that arise during DNA replication

in the presence of ICLs [10] and, indeed, Pso2p was recently found to be a structure-specific DNA hairpin opening endonuclease, whose activity was required for repair of chromosomal breaks containing closed hairpin ends [12]. Thus, besides its 5'-exonuclease function in DNA end resection [11], Pso2p may function in the processing of DNA ends to generate proper substrates for the repair process, as has already been proposed by other authors [34,36]. However, its precise function has remained elusive and there are still many aspects to be elucidated about the function of Pso2p in ICL repair.

The role of Pso2p in yeast ICL-repair could be better understood by its interaction with other proteins were known. Therefore, the aim of this study was to identify potential Pso2p binding partners using the yeast two-hybrid system (THS). Here we present a collection of potential binding partners of Pso2p and demonstrate that Pso2p is a phosphorylation target of protein kinase Sak1 (encoded by the open reading frame YER129w), a temperature-sensitive suppressor of DNA polymerase alpha (Pol α) mutations [37] and also an activating kinase of the Snf1 protein under cellular stress conditions [38]. Furthermore, we show that Pso2p presents an epistatic interaction with Sak1p after cells have been exposed to DNA-ICL inducing agents. The genetic study of the interactions of *PSO2* and *SAK1* with the *YKU70* and *MRE11* revealed no interaction for *YKU70* after growing cells' exposition to DNA-ICL inducing agents, whereas a non-epistatic interaction with *MRE11* gene was detected. Our results point to a Pso2p function in sequential steps with Sak1 kinase to generate free DNA ends for downstream repair events even in the absence of YKu70p. Moreover, Pso2 nuclease competes with Mre11p for the same substrate, acting in separate pathways to repair DNA ICL lesions.

2. Material and Methods

2.1. Yeast strains and media

The relevant genotypes of *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1. The mutants isogenic with wild-type (WT) strain BY4742 were obtained by single step gene replacement [39] using pMS3141I vector containing the *PSO2* coding ORF disrupted with *URA3*. The mutants isogenic with WT strain BY4741 were constructed by disruption of *PSO2* and *SAK1* genes by homologous recombination, using vector pGADT7 for amplification of *pso2::LEU2* and vector pEG202 for amplification of *sak1::HIS3* disruption cassettes, in accordance to Ausubel et al. protocol [40]. The disruption cassettes

were amplified with Platinum[®] high fidelity Taq DNA polymerase (Invitrogen) and the disruption was later confirmed by polymerase chain reaction (PCR). Primers are described in Table 2. Yeast strain EGY48 was kindly provided from Dr. R. Brent (Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA).

Yeast strains were grown in YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) at 30 °C. Auxotrophy and resistance markers were controlled on either synthetic medium - SynCo (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose, 1% ammonium sulfate) supplemented with the appropriate amino acids and bases (40 µg/ml) or YPD plus geneticin (G418, Calbiochem) 0.2 mg/ml, respectively. Plating medium was solidified with 2% agar.

2.2. *Escherichia coli* strains and plasmids

E. coli strains XL1-blue *endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)* (Stratagene), KC8 *pyrF::Tn5, hsdR, leuB600, trpC9830, lacΔ74, strA, galK, hisB436* [41], and TOP10 [*F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*] (Invitrogen) were used for plasmid manipulation and propagation. The following constructions were used: *LexAPSO2-A* (contains the *PSO2* coding ORF from aa 47 to 661, in frame fused to the LexA DNA binding domain of pEG202 using an internal *EcoRI* restriction site); *LexAPSO2-B* (contains the *PSO2* coding ORF from aa 47 to 466, fused in frame to the LexA DNA binding domain of pEG202 via two internal *EcoRI* restriction sites). The first 46 amino acids of *PSO2* gene represent a non-transcribed region (GenBank accession number X64004) and by this reason were omitted from the plasmid. Techniques in yeast genetics and standard molecular techniques were performed according to Burke et al. (2000) and Sambrook and Russell (2001) [42,43].

2.3. Yeast two-hybrid protein-protein interaction

Two-hybrid analysis was essentially as described by Gyuris et al. [44] Two in-frame fusions of the *PSO2* ORF to the LexA DNA binding domain plasmid (pEG202) were constructed for the screening and interaction analysis using the THS. The *LexAPSO2-A* fusion contains the portion from aa 47 to 661 and the *LexAPSO2-B* is a truncated

construction from aa 47 to 466, lacking the last 195 aa of the C-terminal part. Both were constructed using internal *EcoRI* restriction sites and displayed no intrinsic transcriptional activation when transformed into strains containing reporter constructs regulated by LexA DNA-binding sites.

Yeast strain EGY48 containing the sensitive lacZ reporter plasmid pSH18-34 and the bait plasmid *LexAPSO2-A* was transformed with a yeast genomic library cloned into the prey plasmid pJG4-5 [41]. Plasmids were isolated from yeast that survived selection for leucine prototrophy on galactose and showed lacZ expression on X-Gal-galactose plates. *E. coli* strain KC8 was used for the rescue of the plasmids as described by Gyuris et al. [44]. Plasmid DNA was sequenced with an Applied Biosystems sequencer A377 (Foster City, CA). All obtained sequences were submitted to a BLAST search at MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences) [45]. The expression of the LexA fusion baits were analyzed by western blotting using a monoclonal antibody against LexA (Clontech Laboratories Inc.) and by complementation assays in *pso2Δ* mutants. β -galactosidase activity of the pSH18-34 two-hybrid reporter plasmid was assayed and quantified according to Burke et al. [43] using exponential phase cultures (approx. 2×10^7 cells/ml). Three to four individual transformants were assayed in liquid SynCo without the appropriate nutrients.

2.4. Yeast survival assays

Yeast exponential phase cells were obtained by inoculation of an isolated single colony into liquid YPD. Cells were washed in 0.9% NaCl and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS – pH 7.4) to a titer of 1×10^8 cells/ml. In order to evaluate sensitivity to different mutagens, cells were treated in PBS with either UVC at doses ranging from 50 to 150 J/m²; 8-methoxypsoralen (Sigma) plus UVA (8-MOP+UVA) using UVA doses ranging from 0.1 to 1 kJ/m² [4]; nitrogen mustard [Bis(2-chloroethyl)amine hydrochloride, HN2 – Sigma] at concentrations from 6.25 to 50 μ M, or with cisplatin [*cis*-diammine-dichloro-platinum(II), CDDP – Sigma] at concentrations from 50 to 800 μ M. For UVC and 8-MOP+UVA treatments, cells were diluted in 1:10 serial steps immediately after irradiation and plated in triplicate on solid YPD. For HN2 and CDDP treatments, cells were incubated for 120 min in a rotary shaker at 30 °C in the dark. After treatment, cells were appropriately diluted and plated in triplicate on solid YPD. 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. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test, with $p < 0.05$ considered as statistically significant.

2.5. Over-expression and purification of recombinant GST-Pso2p and GST-Sak1p proteins

For expression and purification of Pso2 protein, a 2734 bp *Sna*I-*Sac*I-fragment from pDR3141 [18] was firstly sub cloned into the *Sma*I and *Bam*HI sites of pUC18. From the resulting plasmid, an internal 2014 bp *Bgl*II-*Bam*HI fragment containing the *PSO2* ORF was then cloned into the *Bam*HI site of the vector pGEX-KG (Amersham Biosciences). The GST-Sak1 recombinant protein was obtained from pPH601 expression plasmid (kindly provided by R. Scalfani), which was constructed as described in Hovland et al. [37] into the *Eco*RI site of the vector pGEX-4T-2 (Pharmacia). The GST-Pso2p and GST-Sak1p fusion proteins were expressed in *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS (Novagen) using 0.3 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Sigma) for 180 min and affinity-purified on glutathione-Sepharose 4B (Amersham Biosciences). Pso2p was obtained by thrombin (Amersham Biosciences) cleavage of GST-Pso2p according to the manufacturer's instructions. The protein purification process was monitored by SDS-12% polyacrylamide gel stained with Coomassie Brilliant Blue G 250.

2.6. In vitro phosphorylation assay

Pso2p (8 μ g) was incubated with either GST-Sak1p (2 μ g) or GST (3 μ g) in a protein phosphorylation buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 5 μ M unlabeled ATP and 2 μ Ci of γ - ^{32}P -ATP (3,000 Ci/mmol; Amersham Biosciences), at room temperature for 30 min. Alternatively, GST-Sak1p was incubated alone in order to identify its autophosphorylation activity. The reactions were stopped by adding 10 μ L of 2x SDS sample buffer (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 0.3 M β -mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue) and boiling for 10 min before loading onto a 10% SDS-polyacrylamide gel. After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue G 250, dried, and subjected to autoradiography.

3. Results

3.1. Isolation of potential molecular partners of Pso2 using the THS

A two-hybrid screen was used to identify proteins that may physically interact with Pso2p. The fully complementing *LexAPSO2-A* bait (Fig. 1A) was used in the screening and a population of 2×10^6 individual transformants was obtained after transformation with the prey library. Aliquots were pooled and plated on selective medium containing galactose for induced expression of the activation domain fusion library. Some 320 clones were identified that allowed growth on SynCo-Leu as a result of the activation of the *LexAop::LEU2* reporter construct. These clones were colony-purified, molecularly characterized by restriction mapping, and re-tested after re-transformation for their ability to activate Gal-inducible transcription of two reporter constructs (*LexAop::LEU2* and *pSH18-34*) [44]. We found 47 transformants containing putative interactors, able to activate transcription of the two independent reporter constructs in the presence of *LexAPSO2-A*. Further sequencing of the library plasmids revealed 13 different fusion protein products with 4 of them containing no real ORF sub-fragments or incorrect orientation. The remaining 9 different fusion protein products (Table 3) were unable to induce transcription when co-expressed with unrelated *LexA* DNA-binding domain fusions - *pRFHM1* [37], *LexAPSO5* (yeast *RAD16* allele) and *LexAHDF1* (yeast Ku70 protein) - indicating that the interaction with *LexAPSO2-A* was specific. Two of these putative Pso2p interacting proteins are encoded by ORFs with as yet unknown function. The remaining 7 are encoded by the genes *NRK1*, *SAK1*, *APL6*, *FIR1*, *IFH1*, *REH1* and *ALY2*; their encoded proteins can roughly be grouped into six functional classes: (i) cell cycle and cell wall maintenance (*NRK1*); (ii) DNA synthesis (*SAK1*); (iii) RNA metabolism (*FIR1* and *IFH1*); (iv) an APL3-complex associated protein (*APL6*), (v) protein synthesis - ribosomal large subunit biogenesis (*REH1*) and (vi) endocytosis of plasma membrane proteins (*ALY2*).

We focused our efforts on the study of Pso2p interaction with the most relevant candidate based on published data, i.e., on gene *SAK1* that encodes the protein kinase Sak1 capable of suppressing Pol α mutations via modification/stabilization of thermo-labile DNA polymerases during DNA repair [37] and that also is an activating kinase of the Snf1p under stress conditions [38]. The same C-terminal third of *SAK1* ORF was independently isolated 6 times via THS. The domain isolated in the fusion protein encoded

by *SAK1* is preceded by the kinase consensus motifs (aa 131-450) [37] and corresponds to the last C-terminal third of the protein (aa 618-1142). Using this part of the *SAK1* coding region as query, the non-redundant database (NRDB) and domain databases at NCBI were searched using PSI-BLAST and RPS-BLAST, respectively, and no significant similarity to known deposited domains/proteins were highlighted within this region.

3.2 *Sak1p* interacts with the conserved C-terminal β -CASP domain of *Pso2p*

To evaluate which part of *Pso2p* is required for interaction with its putative binding partner *Sak1p*, we firstly tested the ability of the *Sak1p* prey-fusion protein to induce the expression of *lacZ* and *LEU* reporters in presence of the full *PSO2* complementing bait *LexAPSO2-A* and the truncated construction *LexAPSO2-B* lacking the C-terminal 195 aa. Deletion of the last 195 aa within the β -CASP domain in *LexAPSO2-B* failed to complement *pso2 Δ* mutants (Fig. 1B) and, therefore, was used to determine if the conserved β -CASP domain, essential for WT-like DNA repair, also mediates interaction between its potential molecular partners. The *SAK1* prey fusion product was able to activate both reporters (*lacZ* and *LEU*) in the presence of *LexAPSO2-A* bait (Leu prototrophy and blue colour in galactose-containing SynCo) whereas interaction with *LexAPSO2-B* was considerably reduced (Table 4). This implies that the deletion of the last 195 aa within the conserved β -CASP domain specifically affects the interaction between *Pso2p* with the prey fusion encoded by *SAK1*.

3.3. Genetic interaction between *PSO2* and *SAK1* after induced DNA damage

Three putative *PSO2* interactors *SAK1*, *ALY2* and *YHR080c* were characterized for their response to mutagen treatment. The haploid mutants *aly2 Δ* and *yhr080c Δ* showed WT-like sensitivity to 8-MOP+UVA, UVC, methyl methanesulfonate (MMS), Trenimon, and HN2 (data not shown), whereas the *sak1 Δ* strain was sensitive to 8-MOP+UVA, HN2 and CDDP (Fig. 2). Since all known *pso2* mutant alleles confer high sensitivity to the ICL-inducing 8-MOP+UVA and HN2 treatments but are only moderately sensitive to UVC [4,46], survival was determined in single and double mutants after treatments with these agents. Figure 2A shows that the *sak1* mutation does not affect the sensitivity to UVC compared to WT strain, while it confers sensitivity to 8-MOP+UVA and HN2 treatments (Fig. 2B, C). Furthermore, the double mutation *pso2 Δ sak1 Δ* yields mutants with a *pso2 Δ* -

like sensitivity phenotype, implying an epistatic interaction of the two mutant alleles. Additionally, *sak1Δ* strain showed sensitivity to CDDP (Fig. 2D), even though in a lesser extent, while *pso2Δ* and *pso2Δsak1Δ* mutants exhibited sensitivity comparable to that attained with 8-MOP+UVA and HN2 treatments. The survival data indicates that *SAK1* gene is necessary for normal resistance to 8-MOP+UVA, HN2 and CDDP, and its epistatic interaction with *pso2Δ* points to its contribution in the same pathway specific for repair of DNA lesions induced by bi- or polyfunctional DNA damaging agents.

3.4. Pso2p is phosphorylated by Sak1p in vitro

Since Sak1p was found to interact with Pso2p in the THS screening we aimed to investigate whether this interaction could be confirmed with an *in vitro* protein interaction assay. As a kinase activity was described for Sak1p [37,38] we asked whether Pso2p could be phosphorylated by Sak1p. Phosphorylation assay was carried out with heterologous expressed Pso2p and Sak1p. Results obtained in an *in vitro* phosphorylation assay are shown in Fig. 3. Also Sak1p autophosphorylation activity, firstly reported by Hovland et al. [37], was confirmed (105 kDa GST-Sak1p autophosphorylation signal; Fig. 3, lanes 1 and 2). When purified Pso2p was added, an additional phosphorylated protein signal was observed at the predicted size of Pso2p (76 kDa) (Fig. 3, lane 3). When the concentration of the purified Pso2 protein was increased in relation to that of Sak1p (Fig. 3, lanes 4, 6 and 7) an inhibition of the Sak1p phosphorylation activity was observed, suggesting a possible substrate inhibition effect or an allosteric mechanism. When Pso2p was incubated with GST (encoded by pGEX-KG empty plasmid) no detectable Pso2p phosphorylation occurred, thus showing that Sak1p is necessary for Pso2p phosphorylation *in vitro* (Fig. 3, lane 5). Some interfering signals of lower molecular weight than the expected for the proteins can be seen in the phosphorylation assay, which can be attributed to some protein degradation that occurred during the purification process.

3.5. PSO2 and SAK1 do not interact genetically with YKU70 after 8-MOP photoaddition

DNA-ICL lesions are converted into DSBs during their processing [32], and the yeast Ku heterodimer (hereafter referred to as Ku; encoded by the *YKU70* and *YKU80* genes in *S. cerevisiae*) rapidly binds to DNA ends after DSB formation [47]. DSBs can be produced from cruciform structures that are formed in eukaryotic genome during

replication and transcription [48–50] and in promoter regions of genes with inverted repeats [51], and in this case may result in hairpin-ended DSBs [52]. Thus we asked whether Pso2p endonuclease activity could be acting on these structures in the same pathway with YKu70p. To investigate this hypothesis, we tested the single and double mutants for *YKU70*, *PSO2* and *SAK1* genes, as well as the triple mutant *pso2Δsak1Δyku70Δ* for their 8-MOP+UVA sensitivity.

We observed that 8-MOP photoaddition was accompanied by a low sensitivity for the single mutant *yku70Δ*, while significant and similar sensitivities were observed for *sak1Δ* and *yku70Δsak1Δ* mutants. The *pso2Δsak1Δ*, *pso2Δyku70Δ* as well as the *pso2Δsak1Δyku70Δ* triple mutation yields a *pso2Δ*-like sensitivity phenotype (Fig. 4A and B). We also tested single- and double- disruptants for *PSO2* and *YKU70* genes for HN2 sensitivity (Fig. 4C). Likewise, *yku70Δ* exhibited a WT-like sensitivity after HN2 treatment. Thus, the survival data indicates that *YKU70* gene is involved in a step that is independent of *PSO2* and *SAK1* in the repair pathway of DNA lesions induced by bi- or polyfunctional DNA damaging agents in *S. cerevisiae*.

3.6. MRE11 exhibits a non-epistatic interaction with PSO2 and SAK1 genes after ICL-induction

DSB formation can generate DNA clean (or free) ends that are accessible to downstream proteins, or modified ends (also called complex or dirty), which need further processing [53]. Similarly, hairpin capped ends formed at DNA palindromes are inaccessible to the nucleases [54,55]. Both modified and hairpin capped ends depend on MRX-Sae2 factors to be available for end resection, a necessary step for DNA repair [56]. In order to examine a possible interaction of Pso2p and Sak1p with the MRX complex, we tested the single and double mutants for *MRE11*, *PSO2* and *SAK1* genes, as well for the triple mutant *pso2Δsak1Δmre11Δ*, to 8-MOP+UVA sensitivity. 8-MOP photolesions lead to the production of DSBs with complex DNA-ends [57,58]. The *pso2Δ* and *mre11Δ* single- and the *pso2Δmre11Δ* double mutants were also tested for HN2 sensitivity.

As can be seen in Figure 5A, a non-epistatic interaction was observed between the genes *MRE11*, *PSO2* and *SAK1* after 8-MOP+UVA photoaddition. The triple mutation *pso2Δsak1Δmre11Δ* exhibited a higher sensitivity in relation to all the single and double

mutations analyzed. This non-epistatic interaction observed for *pso2Δ*, *pso2Δsak1Δ* and *pso2Δmre11Δ* in relation to the *pso2Δsak1Δmre11Δ* strain indicates that this mutant alleles are acting on the same substrate (and even competing for it), but not in the same repair pathway. Besides the non-epistatic interaction observed for 8-MOP+UVA treatment (Fig. 5B), survival data obtained for HN2 (Fig. 5C) also confirms a non-epistatic interaction among *PSO2* and *MRE11* genes, in a more pronounced manner.

4. Discussion

The *pso2* and *snm1* mutants were amongst the first yeast isolates found to be specifically sensitive to bi- or polyfunctional mutagens that produce the highly cytotoxic DNA-ICL lesions and, although being extensively studied, the role of *PSO2* as well as of its orthologs in the removal of ICL from DNA is still not well understood [10,14,21,22]. In this work we isolated a set of putative interactors for Pso2p using the THS, besides confirming an epistatic interaction between Pso2p and Sak1p, therefore extending the characterization of *PSO2* involvement in DNA-ICL repair.

SAK1 was the most interesting amongst the putative interactors found for Pso2p, and thus was further investigated. *SAK1* stands for a Pol α suppressing protein kinase, which, when over-expressed, was shown to act as a *RAD9*-dependent, allele-specific suppressor of thermo-labile Pol α mutations, a feature which suggested a possible involvement in cellular responses to DNA damage [37]. Moreover, Sak1p functions in *S. cerevisiae* as the primary Snf1 protein activating kinase [59] by phosphorylation in response to glucose limitation and other cellular stresses [38]. Snf1 (member of the SNF1/AMP-activated protein kinase family – AMPK), in turn, regulates the transcription of many genes involved in, e.g., meiosis and aging [59]. Phosphate-based signaling is critical to almost all major cellular processes. Therefore, the isolation of a known protein kinase via THS was meaningful, demonstrating that Pso2p is a phosphorylation target of the Sak1p *in vitro*. Also, the integrity of the conserved β -CASP domain of Pso2p was clearly shown to be essential for WT-like DNA repair confirming previous reports [9], as well as this domain was shown to be necessary for interaction with Sak1p (Table 4).

As the *sak1Δ* mutant had a DNA repair-deficiency phenotype, at first we tested its genetic interaction with *pso2Δ* mutant alleles in double mutant strains, applying DNA ICL-

inducing agents. According to survival analysis, *pso2Δ* showed epistatic interaction with *sak1Δ* for these treatments. Indeed, a study using DNA microarray to examine genome-wide transcriptional changes produced after 8-MOP+UVA induced DNA photolesions in yeast reported that *SAK1* gene expression was strongly inducible by this treatment [58]. The lower sensitivity found for *sak1Δ* mutant to HN2 and CDDP, in comparison with 8-MOP+UVA, may be caused by the stability characteristics of the DNA lesions induced by these agents. The DNA damage induced upon 8-MOP+UVA exposure differ strikingly from the pyrimidine dimers induced by UV radiation, the single- and double-strand breaks and base lesions induced by IR and the methylated bases induced by methyl methane sulphonate (MMS) [58]. Moreover, the pyrimidine photoadditions induced by 8-MOP+UVA are chemically very stable lesions [60] that clearly differ from the purine mono- and diadducts induced by alkylating crosslinking agents such as HN2 and CDDP [57]. Amongst the DNA lesions induced by 8-MOP+UVA, about 33% comprise ICLs [60], while HN2 adducts consist about of 20% ICLs [61] and CDDP-induced lesions comprise about 90% intrastrand cross-links (Ia-CLs) and only 1-3% ICLs [62]. Considering that ICLs are likely to be more difficult to repair than Ia-CLs, it is reasonable to expect different intermediate structures to be formed in the repair of CDDP-induced damage, that would not require Sak1p to the same extent. Our survival data thus indicate that Sak1p and Pso2p might function in the same pathway that controls sensitivity to DNA ICL-inducing agents.

We notice here that Pso2p is phosphorylated by Sak1 kinase *in vitro*, and this led us to ask what function this post-translational modification might have. It has been shown that phosphorylation of the C-terminal region of Artemis is required to relieve negative regulation of the endonuclease activity [25]. This fact highlights the importance for phosphorylation in regulating the nuclease function of Artemis. Previous results of a phylogram for Pso2p established by *in silico* studies clearly indicate a close phylogenetic relationship of Pso2p to the RAG-1/RAG-2 proteins that are known to have a function in V(D)J recombination [25], and thus can be biochemically defined as proteins with endonucleolytic and phosphotransferase activities [10,14]. This led to the hypothesis that Pso2p might have the ability to open fully paired hairpin structures [10,25] which was recently confirmed by Tiefenbach and Junop [12], who proved endonucleolytic activity for Pso2p specific for the opening of closed hairpin ends and also showed that both Pso2p

exo- and endonuclease activities reside in the same active site. Based on these observations, we propose that phosphorylation of Pso2p by Sak1 kinase could be directing its endonucleolytic activity to the opening of hairpin structures formed due to DNA extrusion between a stalled replication fork and an ICL induced by bi- or polyfunctional DNA damaging-agents. The opening of DNA capped hairpin ends would render DNA ends able to be processed by downstream proteins in the repair pathway. Furthermore, incised ICL intermediates might also be resected by Pso2p 5'-exonuclease activity (independent of phosphorylation) thus providing substrates for downstream reactions of DNA-ICL repair in yeast.

The observation in this study that *YKU70* gene has no interaction with *PSO2* and *SAK1* after cells have been exposed to ICL-inducing agents is in accordance with the findings of Dudás et al. [36], which reported no significant interaction to the pairwise combination Pso2 + YKu70 in a comprehensive THS study. Our results indicate that Pso2p acts in ICL repair in a manner independent of YKu70p binding to DNA ends of the DSB. In higher eukaryotes Ku promptly binds to DNA ends after DSB formation [47] and associates with the DNA-PKcs, which have the kinase activated [63] and, in turn, phosphorylates SNM1C/Artemis [64]. Considering that no homolog for DNA-PKcs has been identified in yeast [65] and that Pso2p presents both exo- and endonuclease activities, we suggest that Pso2 endonuclease may be acting on complex DSBs ends, which need further processing, making them available for downstream proteins. This reaction may provide substrate for a DSB repair pathway that differs from canonical non-homologous end joining (NHEJ) by dispensing Ku, i.e. the microhomology-mediated end joining (MMEJ) [66]. Absence of error-prone MMEJ would explain the fact that *pso2Δ* mutant is blocked in mutagenesis [10,67].

Our results for the non-epistatic interaction between *PSO2* and *MRE11* genes are in agreement to previous data, which showed that Pso2 account for 95% of the fully paired hairpin opening activity in *S. cerevisiae* [68]. Although both Pso2 and MRX complex act on DNA hairpin processing, Pso2p is more efficient to open fully paired hairpins, while the MRX complex has a greater ability to process structures generated at long inverted repeats [56]. Moreover, resection of free DNA ends can occur in the absence of MRX and Sae2 nuclease, but resection of modified ends depends on these factors [53] and, as indicated by our study, it also depends on Pso2 nuclease and Sak1 kinase activities. This fact supports

the synergistic interaction observed between *PSO2*, *SAK1* and *MRE11* genes, where different pathways compete for the same substrate.

In accordance with our proposed model [10] the association of Pso2p with Sak1p kinase may direct its enzymatic activity on a DNA post-incision substrate for normal DNA repair function in yeast. Likewise, Sak1p could activate Pso2p endonucleolytic activity to allow the processing of capped hairpin structures generated as a consequence of cruciforms and DSBs formed after ICL induction by bi- or polyfunctional DNA damaging-agents. Thus, considering the results of the present study, Pso2p may act for repair of ICL lesions in different ways: at G2/S phase, to provide substrates for HR (that depends on MRX and downstream extensive resection by Exo1 nuclease) or for MMEJ (independent of Ku); at G1 phase, in case of NHEJ (dependent of Ku) unavailability, to yield substrate to MMEJ, that is active independent of cell cycle phases. Incised ICL intermediates might also be resected by Pso2p 5'-exonuclease activity, providing substrates for downstream reactions. A scheme of this actualized model is presented in Fig. 6.

Even though the mechanistic details of ICL repair have yet to be clarified, Pso2p certainly plays a central role in ICL removal in yeast [22]. The *PSO2/SNM1* gene family has a clear role in the maintenance of genomic integrity, and is present from yeast to humans. In addition, Bonatto et al. [15] identified the β -CASP domain in plants, which was recently characterized in *Arabidopsis thaliana* [69], thus extending the distribution of Pso2/SNM1 protein family to plants. In this report, we have identified new features on Pso2p interaction with a protein kinase, thus allowing a better understanding of its activity in intermediate structures formed on DNA during repair of ICLs. There are a number of reports that in yeast further processing of intermediate structures generated during ICL-repair involves proteins of NER as well as of HR, NHEJ and TLS [12,27,34,70–72], indicating a high degree of redundancy and versatility in the response to DNA damage. In view of this, while further studies will be required to elucidate some aspects of our proposed model, the data presented here may lead to new biochemical approaches to molecularly define how the various sub-pathways contribute to the post incision steps of ICL repair in yeast.

Acknowledgements

We thank Dr. R. Brent for kindly providing plasmids and strains, Dr. Heidi Feldmann for the valuable contribution with the two-hybrid analysis. FMM held fellowship of CAPES. LFR held fellowship of CNPq. Collaborative research was sponsored by DAAD-CAPES, DAAD-CNPq travel grants to LFR, MB and JAPH. This work was supported by, PRONEX/FAPERGS/ CNPq 10/004-3 and Genotox-Royal Insitute.

References

- [1] M. Brendel, J.A.P. Henriques, The *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism, *Mutat. Res.* 489 (2001) 79–96.
- [2] K.M. Vasquez, Targeting and processing of site-specific DNA interstrand crosslinks, *Environ. Mol. Mutagen.* 51 (2010) 527–539.
- [3] Y.M.N. Akkari, R.L. Bateman, C.A. Reifsteck, S.B. Olson, M. Grompe, DNA replication is required to elicit cellular responses to psoralen-induced DNA interstrand cross-links. *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 8283–8289.
- [4] J.A.P. Henriques, E. Moustacchi, Isolation and characterization of *pso* mutants sensitive to photoaddition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 95 (1980) 273-288.
- [5] W. Siede, M. Brendel, Isolation and characterization of yeast mutants with thermoconditional sensitivity to the bifunctional alkylating agent nitrogen mustard, *Curr. Genet.* 4 (1981) 145–149.
- [6] C. Cassier-Chauvat, E. Moustacchi, Allelism between *pso1-1* and *rev3-1* mutants and between *pso2-1* and *snm1* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.* 13 (1988) 37–40.
- [7] J.A.P. Henriques, M. Brendel, The role of *PSO* and *SNM* genes in dark repair of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.* 18 (1990) 387-393.
- [8] J.A.P. Henriques, J. Brozmanova, M. Brendel, Role of *PSO* genes in the repair of photoinduced interstrand cross-links and photooxidative damage in the DNA of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Photochem. Photobiol. B.* 39 (1997) 185–196.
- [9] X. Li, R.E. Moses, The beta-lactamase motif in *Snm1* is required for repair of DNA double-strand breaks caused by interstrand crosslinks in *S. cerevisiae*, *DNA Repair.* 2 (2003) 121–129.

- [10] M. Brendel, D. Bonatto, M. Strauss, L.F. Revers, C. Pungartnik, J. Saffi, J.A.P. Henriques, Role of *PSO* genes in repair of DNA damage of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutat. Res.* 544 (2003) 179–193.
- [11] X. Li, J. Hejna, R.E. Moses, The yeast *Snm1* protein is a DNA 5'-exonuclease, *DNA Repair* 4 (2005) 163–170.
- [12] T. Tiefenbach, M. Junop, *Pso2* (*SNM1*) is a DNA structure-specific endonuclease, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 2131–2139.
- [13] I. Callebaut, D. Moshous, J.P. Mornon, J.P. de Villartay, Metallo-beta-lactamase fold within nucleic acids processing enzymes: the beta-CASP family, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 3592–3601.
- [14] D. Bonatto, L. F. Revers, M. Brendel, J.A.P. Henriques, The eukaryotic *Pso2/Snm1/Artemis* proteins and their function as genomic and cellular caretakers, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38 (2005) 321–334.
- [15] D. Bonatto, M. Brendel, J.A.P. Henriques, A new group of plant-specific ATP-dependent DNA ligases identified by protein phylogeny, hydrophobic cluster analysis and 3-dimensional modeling, *Funct. Plant. Biol.* 32 (2005) 161–174.
- [16] C. Lenain, S. Bauwens, S. Amiard, M. Brunori, M.J.Giraud-Panis, E. Gilson, The Apollo 52 exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair, *Curr. Biol.* 16 (2006) 1303–1310.
- [17] J. Hejna, S. Philip, J. Ott, C. Faulkner, R. Moses, The hSNM1 protein is a DNA 5'-exonuclease, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 6115 – 6123.
- [18] D. Richter, E. Niegemann, M. Brendel, Molecular structure of the DNA cross-link repair gene *SNM1* (*PSO2*) of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Gen. Genet.* 231 (1992) 194–200.
- [19] R. Wolter, W. Siede, M. Brendel, Regulation of *SNM1*, an inducible *Saccharomyces cerevisiae* gene required for repair of DNA cross-links, *Mol. Gen. Genet.* 250 (1996) 162–168.
- [20] X. Zhang, C. Richie, R.J. Legerski, Translation of hSNM1 is mediated by an internal ribosome entry site that upregulates expression during mitosis, *DNA Repair* 1 (2002) 379–390.
- [21] Y. Yan, S. Akhter, X. Zhang, Legerski R, The multifunctional *SNM1* gene family: not just nucleases, *Future Oncol.* 6 (2010) 1015–1029.

- [22] E. Cattell, B. Sengerová, P.J. McHugh, The SNM1/Pso2 family of ICL repair nucleases: From yeast to man, *Environ. Mol. Mutagen.* 51 (2010) 635–645.
- [23] A. Hazrati, M. Ramis-Castellort, S. Sarkar, L.J. Barber, C.J. Schofield, J.A. Hartley, P.J. McHugh, Human SNM1A suppresses the DNA repair defects of yeast *pso2* mutants, *DNA Repair.* 7 (2008) 230–238.
- [24] D. Bonatto, M. Brendel, J.A.P. Henriques, The eukaryotic Pso2p/Snm1p family revisited: *in silico* analyses of Pso2p A, B and Plasmodium groups, *Comput. Biol. Chem.* 29 (2005) 420–433.
- [25] Y. Ma, U. Pannicke, k. Schwarz, M.R. Lieber, Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination, *Cell.* 108 (2002) 781–794.
- [26] D. Moshous, I. Callebaut, R. de Chasseval, B. Corneo, M. Cavazzana-Calvo M... et al., Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency, *Cell.* 105 (2001) 177–186.
- [27] J.A.P. Henriques. E. Moustacchi, Interaction between mutations for sensitivity to psoralen photoaddition (*pso*) and to radiation (*rad*) in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* 148 (1981) 248–256.
- [28] W. Jachymczyk, R. von Borstel, M. Mowat, P. Hastings, Repair of interstrand crosslinks in DNA of *Saccharomyces cerevisiae* requires two systems for DNA repair: the RAD3 system and the RAD51 system, *Mol Gen Genet* 182 (1981) 196–205.
- [29] S. Sarkar, A. Davies, H.D. Ulrich, P.J. McHugh, DNA interstrand crosslink repair during G1 involves nucleotide excision repair and DNA polymerase zeta, *EMBO J.* 25 (2006) 1285–1294.
- [30] J.J. Rahn, G.M. Adair, R.S. Nairn, Multiple roles of ERCC1-XPF in mammalian interstrand crosslink repair, *Environ. Mol. Mutagen.* 51 (2010) 567–581.
- [31] T.V. Ho, A. Guainazzi, S.B. Derkunt, M. Enoiu, O.D. Schärer, Structure-dependent bypass of DNA interstrand crosslinks by translesion synthesis polymerases, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 7455–7464.
- [32] P. Lehoczky, P.J. McHugh, M. Chovanec, DNA interstrand cross-link repair in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol. Rev.* 31 (2007) 109–133.
- [33] T.V. Ho, O.D. Schärer, Translesion DNA synthesis polymerase in DNA interstrand crosslink repair, *Environ. Mol. Mutagen.* 51 (2010) 552–566.

- [34] N. Magaña-Schwencke, J.A.P. Henriques, R. Chanet, E. Moustacchi, The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced crosslinks in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair-deficient strains, *PNAS*. 79 (1982) 1722–1726.
- [35] F. Wilborn, M. Brendel, Formation and stability of interstrand cross-links induced by cis-diamminedichloroplatinum and trans-diamminedichloroplatinum (II) in the DNA of *Saccharomyces cerevisiae* strains differing in repair capacity, *Curr. Genet.* 16 (1989) 331–338.
- [36] A. Dudás, D. Vlasáková, Z. Dudásová, D. Gabcová, J. Brozmanová, M. Chovanec, Further characterization of the role of Pso2 in the repair of DNA interstrand cross-link-associated double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*, *Neoplasma*. 54 (2007) 189–194.
- [37] P.G. Hovland, M. Tecklenberg, R.A. Sclafani, Overexpression of the protein kinase Pak1 suppresses yeast DNA polymerase mutations, *Mol. Gen. Genet.* 256 (1997) 45–53.
- [38] S.P. Hong, F.C. Leiper, A. Woods, D. Carling, M. Carlson, Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases, *PNAS*. 100 (2003) 8839–8843.
- [39] R.J. Rothstein, One-step gene disruption in yeast, *Methods Enzymol.* 101 (1983) 202–211.
- [40] F. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, *Short Protocols in Molecular Biology*, third ed., John Wiley & Sons Inc, New York, 1995.
- [41] P.M. Watt, E.J. Louis, R.H. Borts, I.D. Hickson, Sgs1: A eukaryotic homolog of E. coli RecQ that interacts with topoisomerase II *in vivo* and is required for faithful chromosome segregation, *Cell*. 81 (1995) 253–260.
- [42] J. Sambrook, D. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 2001.
- [43] D. Burke, D. Dawson, T. Stearns, *Methods in Yeast Genetics - a Cold Spring Harbour Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 2000.
- [44] J. Gyuris, E. Golemis, H. Chetkov, R. Brent, Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2, *Cell*. 75 (1993) 791–803.
- [45] H.W. Mewes, D. Frishman, C. Gruber, B. Geier, D. Haase, A. Kaps, K. Lemcke, G. Mannhaupt, F. Pfeiffer, C. Schüller, S. Stocker, B. Weil, MIPS: a database for genomes and protein sequences, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 37–40.

- [46] A. Ruhland, E. Haase, W. Siede, M. Brendel, Isolation of yeast mutants sensitive to the bifunctional alkylating agent nitrogen mustard, *Mol. Gen. Genet.* 181 (1981) 346–351.
- [47] W. Wu, M. Wang, S.K. Singh, T. Mussfeldt, G. Iliakis, Repair of radiation induced DNA double strand breaks by backup NHEJ is enhanced in G2, *DNA Repair.* 7 (2008) 329–338.
- [48] E. Palecek, Local supercoil-stabilized DNA structures, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26 (1991) 151–226.
- [49] K. van Holde, J. Zlatanova, Unusual DNA structures, chromatin and transcription, *Bioessays.* 16 (1994) 59–68.
- [50] C.T. Lin, Y.L. Lyu, L.F. Liu, A cruciform-dumbbell model for inverted dimer formation mediated by inverted repeats. *Nucleic. Acids. Res.* 25 (1997) 3009–3016.
- [51] V. Brázda, R.C. Laister, E.B. Jagelská, C. Arrowsmith, Cruciform structures are a common DNA feature important for regulating biological processes, *BMC Mol. Bio.* 12 (2011) 33.
- [52] S.M. Lewis, A.G. Coté, Palindromes and genomic stress fractures: bracing and repairing the damage, *DNA Repair.* 5 (2006) 1146–1160.
- [53] L.S. Symington, J. Gautier, Double-strand break end resection and repair pathway choice, *Annu. Rev. Genet.* 45 (2011) 247–271.
- [54] L. Balakrishnan, P. Polaczek, S. Pokharel, J.L. Campbell, R.A. Bambara, Dna2 exhibits a unique strand end-dependent helicase function, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 38861–38868.
- [55] B.I. Lee Bi, L.H. Nguyen, D. Barsky, M. Fernandes, D.M. Wilson, Molecular interactions of human Exo1 with DNA, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 942–949.
- [56] K.S. Lobachev, D.A. Gordenin, M.A. Resnick, The Mre11 complex is required for repair of hairpin-capped double-strand breaks and prevention of chromosome rearrangements, *Cell.* 108 (2002) 183–193.
- [57] H. Zheng, X. Wang, R.J. Legerski, P.M. Glazer PM, L. Li L, Repair of DNA interstrand cross-links: Interactions between homology-dependent and homology-independent pathways, *DNA Repair.* 5 (2006) 566–574.
- [58] M. Dardalhon, W. Lin, A. Nicolas, D. Aeverbeck, Specific transcriptional responses induced by 8-methoxypsoralen and UVA in yeast, *FEMS Yeast Res.* 7 (2007) 866–878.

- [59] Y. Liu, X. Xu, M. Carlson, Interaction of SNF1 protein kinase with its activating kinase Sak1, *Eukaryotic Cell* .10 (2011) 313–319.
- [60] J.A.P. Henriques, H.H. Andrade, M. Bankmann, M. Brendel, Reassessing the genotoxic potential of 8-MOP + UVA-induced DNA damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.* 16 (1989) 75–80.
- [61] M. Kircher, M. Brendel, DNA alkylation by mustard gas in yeast strains of different repair capacity, *Chem. Biol. Interact.* 44 (1983) 27–39.
- [62] M. Kartalou, L.D. Samson, J.M. Essigmann, Cisplatin adducts inhibit 1,N(6)-ethenoadenine repair by interacting with the human 3-methyladenine DNA glycosylase, *Biochem.* 39 (2000) 8032–8038.
- [63] C.W. Anderson, S.P. Lees-Miller, The nuclear serine/threonine protein kinase DNA-PK, *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expr.* 2 (1992) 283–314.
- [64] Y. Ma, U. Pannicke, H. Lu, D. Niewolik, K. Schwarz, M.R. Lieber, The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit phosphorylation sites in human Artemis, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 33839–33846.
- [65] A. Jazayeri, S.P. Jackson, Screening the yeast genome for new DNA-repair genes, *Genome Biol.* 3 (2002) 1009.1–1009.5.
- [66] L.S. Symington, Role of *RAD52* epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 (2002) 630–670.
- [67] C. Cassier, R. Chanet, J.A.P. Henriques, E. Moustacchi, The effects of three *PSO* genes on induced mutagenesis: A novel class of mutationally defective yeast, *Genetics* 96. (1980) 841–857.
- [68] A.F. Lam, B.O. Krogh, L.S. Symington, Unique and overlapping functions of the Exo1, Mre11 and Pso2 nucleases in DNA repair, *DNA Repair.* 7 (2008) 655–662.
- [69] W.M. Waterworth, G. Masnavi, R.M. Bhardwaj, Q. Jiang, C.M. Bray, C.E. West, A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity, *Plant J.* 63 (2010) 848–860.
- [70] 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.
- [71] J. Yu, K. Marshall, M. Yamaguchi, J.E. Haber, C.F. Weil, Microhomology-dependent end joining and repair of transposon-induced DNA hairpins by host factors in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 1351–1364.

- [72] L.J. Barber, T.A. Ward, J.A. Hartley, P.J. McHugh, DNA interstrand cross-link repair in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: Overlapping roles for *PSO2* (*SNM1*) with MutS factors and *EXO1* during S phase, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 2297–2309.

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

Strain	Relevant genotype	Source
BY4741	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; met15Δ0</i>	Euroscarf
<i>pso2Δ</i>	BY4741; with <i>pso2::LEU2</i>	this study
<i>sak1Δ</i>	BY4741; with <i>sak1::HIS3</i>	this study
<i>yku70Δ</i>	BY4741; with <i>yku70::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>pso2Δsak1Δ</i>	BY4741; with <i>pso2::LEU2; sak1::HIS3</i>	this study
<i>pso2Δyku70Δ</i>	BY4741; with <i>yku70::kanMX4; pso2::LEU2</i>	this study
<i>sak1Δyku70Δ</i>	BY4741; with <i>yku70::kanMX4; sak1::HIS3</i>	this study
<i>pso2Δsak1Δyku70Δ</i>	BY4741; with <i>yku70::kanMX4; pso2::LEU2; sak1::HIS3</i>	this study
<i>aly2Δ</i>	BY4742; with <i>aly2::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>yhr080cΔ</i>	BY4742; with <i>yhr080c::kanMX4</i>	Euroscarf
EGY48	<i>MATα; ura3; his3; trp1; LexAOp(6)::LEU2</i>	R. Brent ^a
BY4742	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ0</i>	Euroscarf
<i>pso2Δ</i>	BY4742; with <i>pso2::URA3</i>	this study
<i>sak1Δ</i>	BY4742; with <i>sak1::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>pso2Δsak1Δ</i>	BY4742; with <i>sak1::kanMX4; pso2::URA3</i>	this study
<i>mre11Δ</i>	BY4742; with <i>mre11::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>mre11Δpso2Δ</i>	BY4742; with <i>mre11::kanMX4; pso2::LEU2</i>	this study
<i>mre11Δsak1Δ</i>	BY4742; with <i>mre11::kanMX4; sak1::HIS3</i>	this study
<i>mre11Δpso2Δsak1Δ</i>	BY4742; with <i>mre11::kanMX4; pso2::LEU2; sak1::HIS3</i>	this study

^aMassachusetts General Hospital, Boston, MA, USA

Table 2 Primers used in this study.

Name	Sequence	Product lenght
<i>pso2Δ::LEU2</i>	5' ATGTCAAGGAAATCTATAGTGCAAATAAGAAGATCT GAAGGGTCAGGTTGCTTTCTCAGG 3' 5' TTATTTAGCCGCCCGCGTTTTCTTAACGTTTTCCCAAC ATTTTATGCTTCCGGCTCGTAT 3'	1790 bp
<i>sak1Δ::HIS3</i>	5' ATG GAT AGG AGT GAT AAA AAA GTT AAC GTC GAA GAG GTC AGA CAC GTA TAG AAT GAT GCA 3' 5' TCA TGG AAG TGC ACT CCT TCA CTT CTC TTC ATT TAG TTC AAG GTA TCG TTA GAA CAC GGC 3'	1151 bp
<i>PSO2</i>	5' GAGACTATCTCTCAGTACTT 3' 5' ATTTTGGCGTTGCTTCGAAA 3'	347 bp
<i>SAK1</i>	5' AGC GAT AAG TCA GGC TCC AA 3' 5' ATG CAG CGT CAA GTC ATC CAT A 3'	633 bp

Table 3 Genes isolated in a two-hybrid screen using *LexAPSO2-A* as bait.

Gene ^a	Gene/protein information ^{b,c}	Extent of fusion ^d
<i>KIC1</i> (22)	Ser/Thr protein kinase that interacts with Cdc31; required for cell integrity and morphogenesis; involved in cell wall biogenesis; 3.8 fold induction after MMS treatment; cytoplasmic localization; CH139, CH361; CH539	Amino acids 832-1432
<i>SAK1</i> (6)	DNA synthesis; protein kinase capable of suppressing DNA polymerase alpha mutations (<i>cdc17-1</i>); <i>RAD9</i> gene product is required for the suppression; upstream serine/threonine kinase for the SNF1 complex; partially redundant with Elm1 and Tos3; members of this family have functional orthology with LKB1, a mammalian kinase associated with Peutz-Jeghers cancer-susceptibility syndrome; CG166	C-terminal third of the protein
<i>REH1</i> (4)	Cytoplasmic 60S subunit biogenesis factor, associates with pre-60S particles; similar to Rei1 and shares partially redundant function in cytoplasmic 60S subunit maturation; contains dispersed C2H2 zinc finger domains	Amino acids 60-327
<i>YKR015c</i> (4)	Putative protein of unknown function	C-terminal third of the protein
<i>APL6</i> (3)	Beta3-like subunit of the yeast AP-3 complex; functions in transport of alkaline phosphatase to the vacuole via the alternate pathway; exists in both cytosolic and peripherally associated membrane-bound pools	C-terminal 90 amino acids
<i>FIR1</i> (1)	3' RNA processing/modification; interacts with <i>REF2</i> ; a positive regulator of poly(A) synthesis	Starts at amino acid 251
<i>IFH1</i> (1)	Co-activator that regulates transcription of ribosomal protein (RP) genes; recruited to RP gene promoters during optimal growth conditions via Fhl1; subunit of CURI, a complex that coordinates RP production and pre-rRNA processing	C-terminal half of the protein
<i>YHR080c</i> (1)	Protein of unknown function that may interact with	Amino acids 340-713

	ribosomes, based on co-purification experiments; the authentic, non-tagged protein is detected in highly purified mitochondria in high-throughput studies; 6.2-fold induction after MMS treatment	
<i>ALY2</i> (1)	Alpha arrestin that controls nutrient-mediated intracellular sorting of permease Gap1; interacts with AP-1 subunit Apl4; phosphorylated by Npr1 and also by cyclin-CDK complex Pcl7-Pho85; promotes endocytosis of plasma membrane proteins; 1.7-fold induction after MMS treatment	C-terminal half of the protein

^a Frequency of independent isolation is shown in parentheses

^b According to Güldener et al. [73] and SGD (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>)

^c CH# indicates association of the respective isolate with the protein complex reported by Ho et al. [74] and CG# indicates association of the respective isolate with the protein complex reported by Gavin et al. [75][86](Gavin et al., 2002)

^d Segment of each ORF fused to the transcriptional activation domain constructs

Table 4 Comparison of β -Galactosidase activity between Pso2p and Sak1p^a with either *LexAPSO2-A* or the *LexAPSO2-B* baits.

DNA binding domain plasmid (pEG202)	Activation domain plasmid (pJG4-5)	Galactose	
		Leu	β -Galactosidase activity ^b
pLexA GAL4	pJG4-5 (HA-tagged)	++	697±54.4
pLexA Bicoid	pJG4-5 (HA-tagged)	-	6.5±2.0
<i>LexAPSO2-A</i>	pJG4-5-SAK1 (aa 618-1142)	++	82.82±17.6
<i>LexAPSO2-B</i>	pJG4-5-SAK1 (aa 618-1142)	-	3.5±2.3

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

^b Expressed in Miller Units. The values are averages from three to four independent transformants each assayed in duplicate. BLUE indicates strong coloring in solid galactose SynCo media

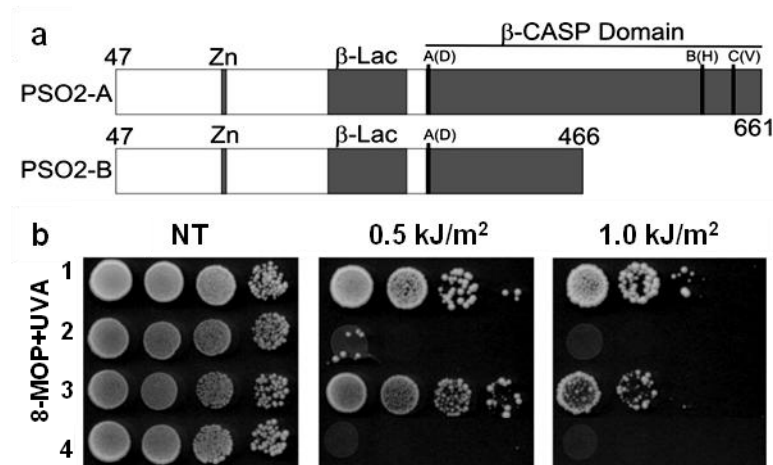


Fig. 1 *LexAPSO2* bait constructs and complementation assays after mutagen treatment. **(a)** Length in aa of the *LexAPSO2-A* (PSO2-A) and *LexAPSO2-B* (PSO2-B) bait constructs and the position of predicted conserved domains: putative zinc finger domain (Zn); β -lactamase (β -lac); and the β -CASP region with the three conserved motifs represented for β -CASP proteins acting on DNA substrates [A (aspartic acid), B (histidine) and C (valine)]. **(b)** 8-MOP + UVA treatment: (1) BY4742 (WT) strain containing the pEG202 empty plasmid, (2) *pso2* Δ strain containing the pEG202 empty plasmid, (3) *pso2* Δ strain containing the *LexAPSO2-A* bait construction, (4) *pso2* Δ strain containing the *LexAPSO2-B* bait construction.

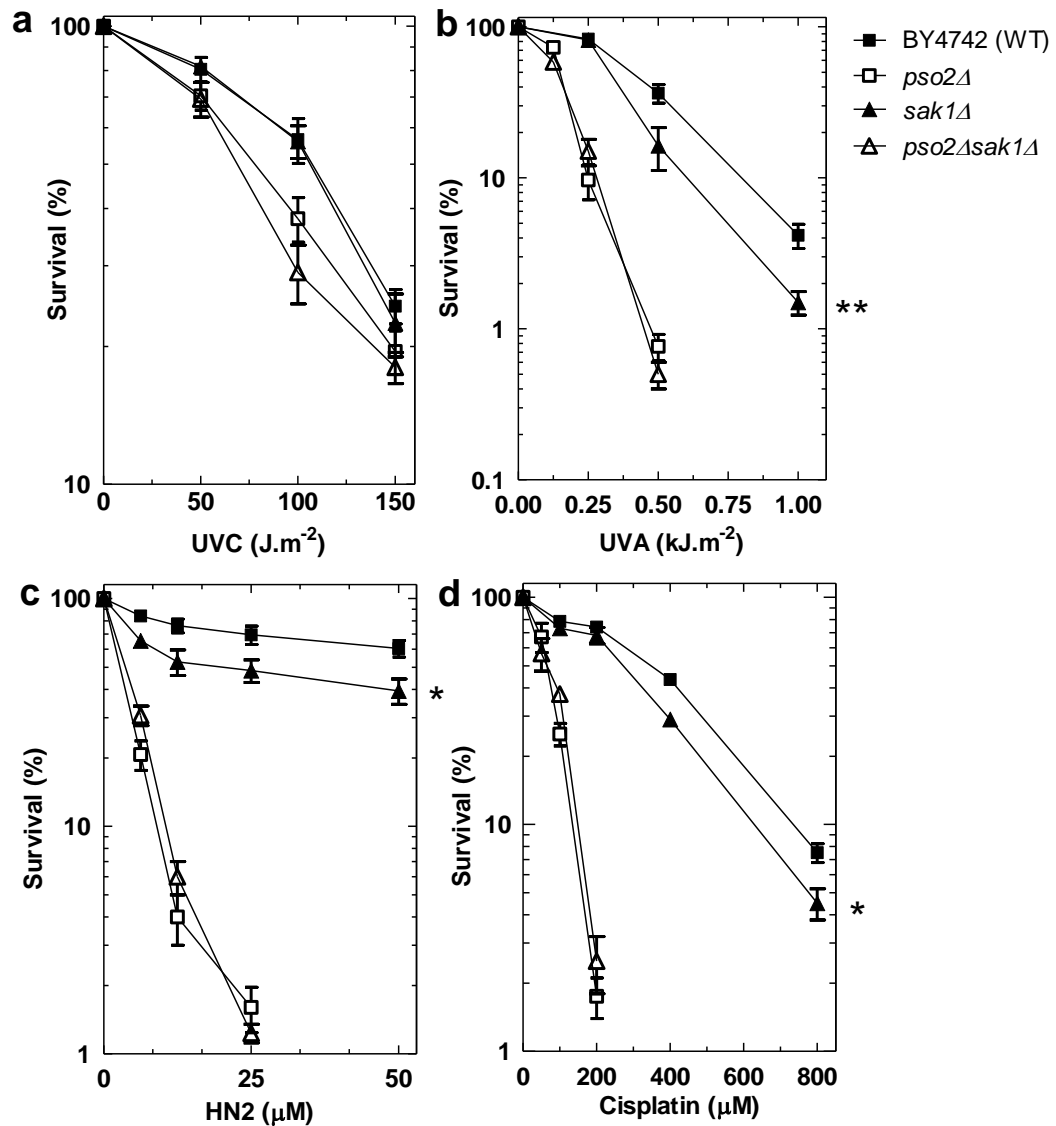


Fig. 2 Survival of haploid BY4742 (WT), *sak1Δ*, *pso2Δ* and *pso2Δsak1Δ* mutants of *S. cerevisiae* after treatment with (a) UVC, (b) 8-MOP+UVA, (c) HN2 and (d) CDDP. The symbol * represents $P < 0.05$ and ** represents $P < 0.01$ as tested by one-way ANOVA (Tukey test): *sak1Δ* mutants were compared to BY4742 (WT).

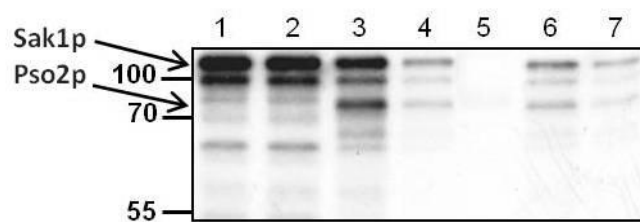


Fig. 3 *In vitro* phosphorylation of Pso2p by Sak1p. The arrows indicate position of the autophosphorylated Sak1 protein and the phosphorylated Pso2 protein. Molecular weight markers are indicated in kDa. *Lanes* (1) Sak1p; (2) Sak1p + trombin; (3) 8 µg Pso2p + 2 µg Sak1p; (4) 16 µg Pso2p + 2 µg Sak1p; (5) 8 µg Pso2p + 3 µg GST (control); (6) 24 µg Pso2p + 4 µg Sak1p; (7) 40 µg Pso2p + 4 µg Sak1p.

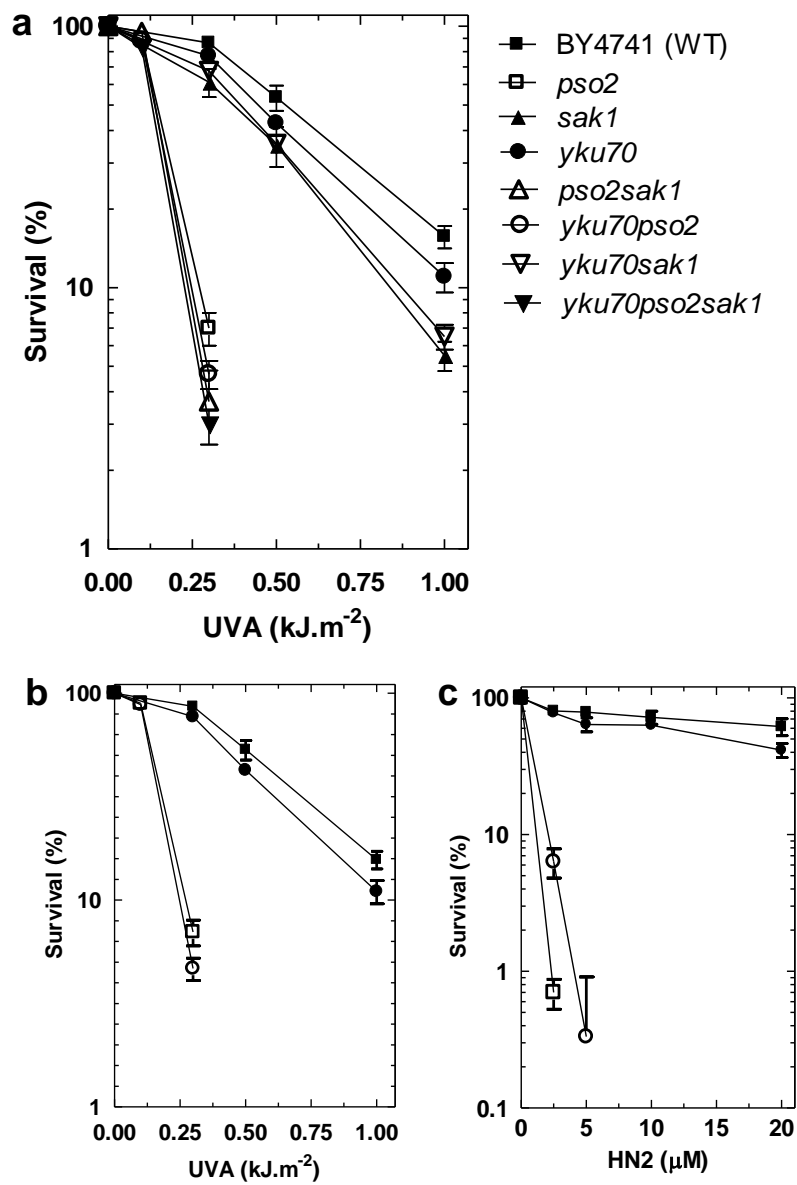


Fig. 4 Survival of haploid *S. cerevisiae* BY4741 (WT) and isogenic single-, double- and triple mutants for *PSO2*, *SAK1* and *YKU70* genes after treatment with 8-MOP+UVA (**a**) and BY4741, *pso2* Δ , *yku70* Δ and *pso2* Δ *yku70* Δ after (**b**) 8-MOP+UVA and (**c**) HN2 treatment.

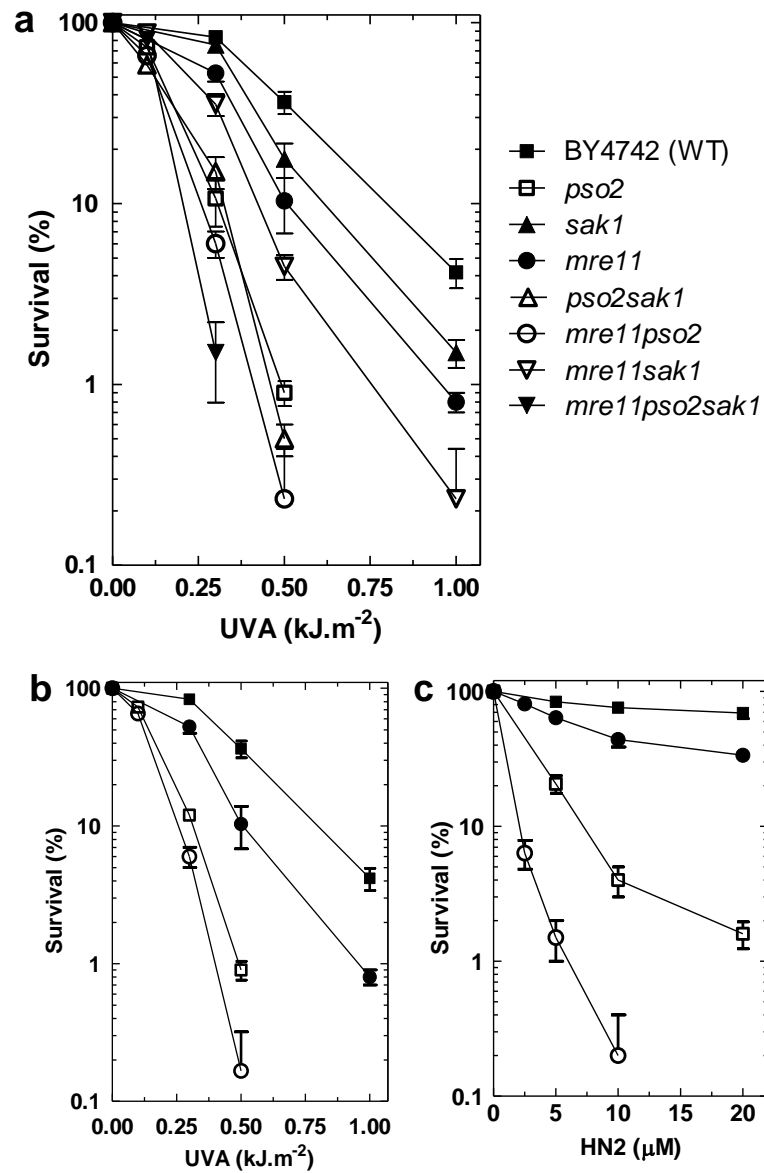


Fig. 5 Survival of haploid *S. cerevisiae* BY4742 (WT) and isogenic single-, double- and triple mutants for *PSO2*, *SAK1* and *MRE11* genes after treatment with 8-MOP+UVA (**a**) and BY4742, *pso2* Δ , *mre11* Δ and *pso2* Δ *mre11* Δ after (**b**) 8-MOP+UVA and (**c**) HN2 treatment.

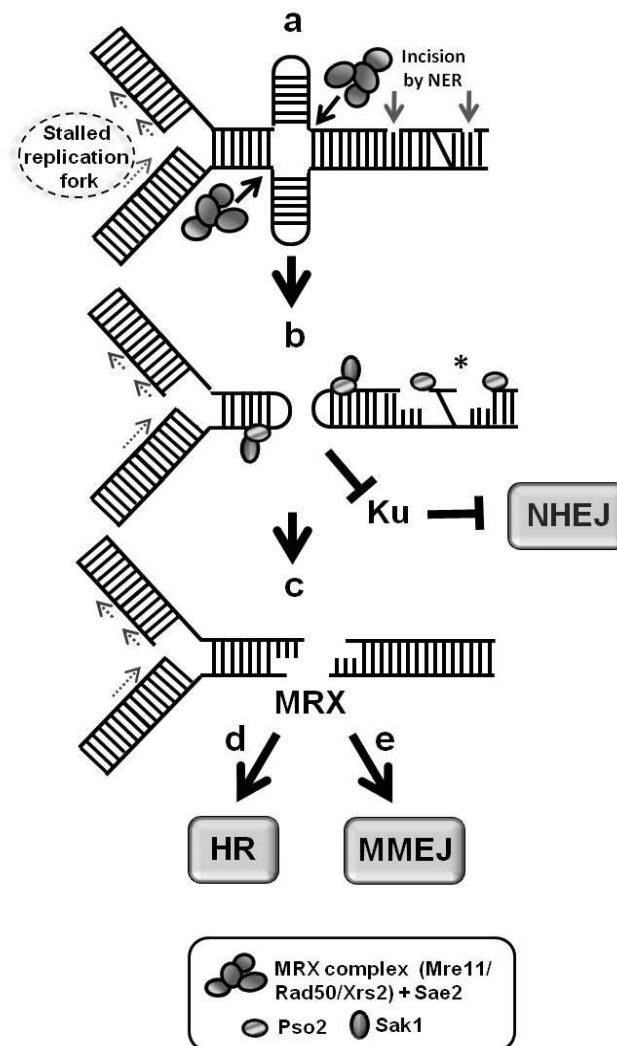


Fig. 6 Model of putative function of the interacting Pso2p and Sak1p in repair of DNA-ICL in yeast. (a) Formation of cruciform structure due to DNA extrusion between a stalled replication fork and a DNA-ICL induced by bifunctional alkylating agent (e.g., 8-MOP+UVA) in exponentially growing cells. Cruciform is recognized and incised by MRX complex and Sae2. Region near ICL is incised by NER endonucleases. **(b)** Formation of DNA capped hairpin ends. The internal nicks resulting are ready substrates for re-sealing by ligation [52]. Incised ICL intermediates might be resected by Pso2p 5'-exonuclease activity (indicated by an asterisk), providing substrates for downstream reactions. Additionally, Sak1p interacts with Pso2p and hairpin is cleaved by its endonuclease activity. **(c)** Free ends are generated and Pso2p 5'-exonuclease activity might act in the

resection of the opened-hairpin extremities. Complex ends are formed, that are inaccessible for Ku complex, impairing NHEJ. MRX complex is necessary and direct repair to **(d)** HR (error-free) or **(e)** MMEJ (error-prone).

Capítulo III

Resultados complementares da Tese.

Este capítulo foi redigido em inglês, visto que será parte integrante de um artigo a ser publicado.

Supplementary Results for

Study of *Saccharomyces cerevisiae* PSO2 Gene Interactions with DNA Damage Response Genes after Treatment with Interstrand Crosslink-Inducing Agents

Fernanda M. Munari^a, Bruna F. Immich^{a,c}, Knulp S. P. Vilar^a, Dinara J. Moura^c, Temenouga N. Guecheva^{a,b}, Jenifer Saffi^c, João A. P. Henriques^{a,b,d}

^a Biotechnology Center, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 91507-970 Porto Alegre, RS, Brazil

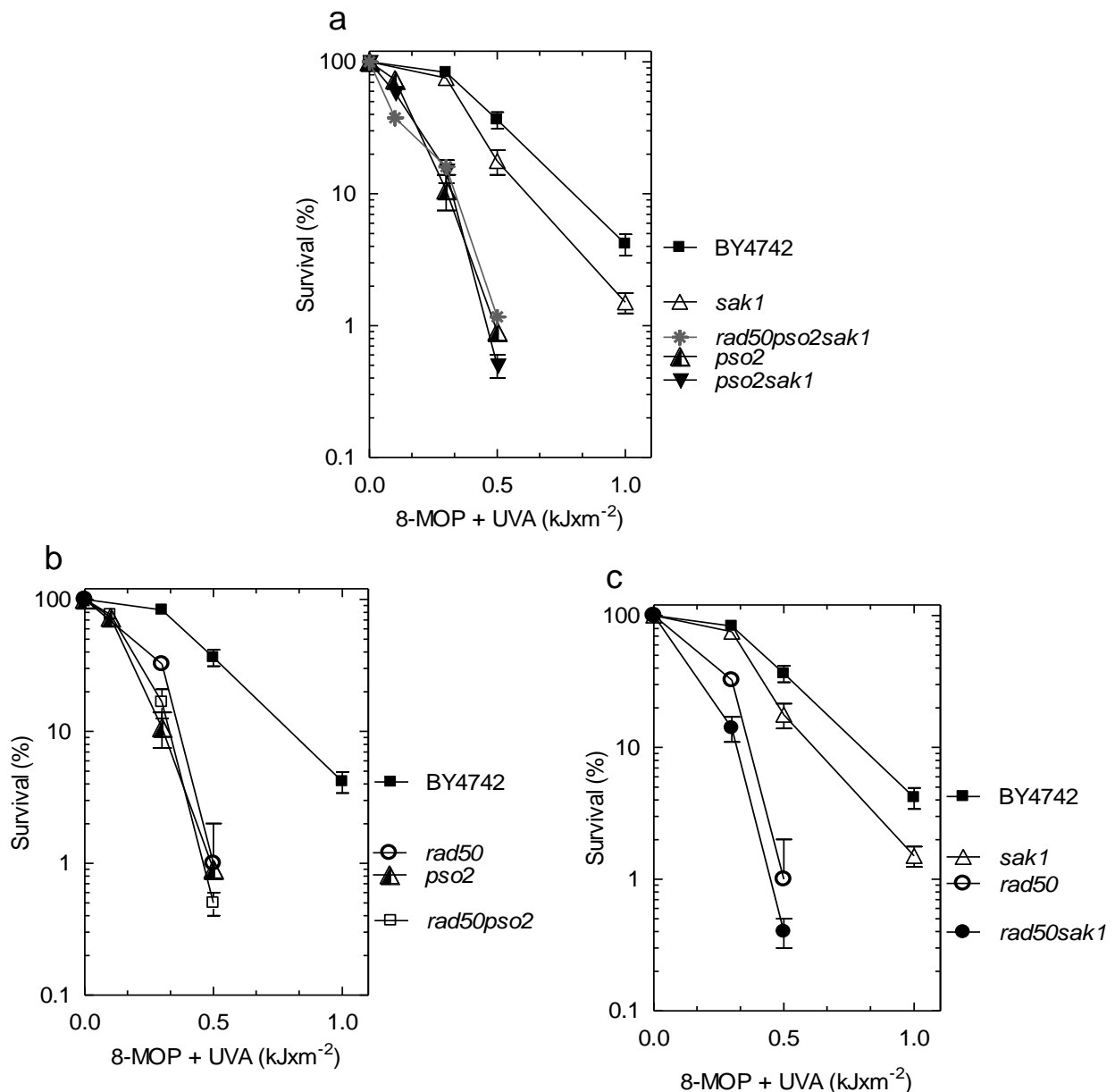
^b Department of Biophysics, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 91507-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul (UCS), 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil

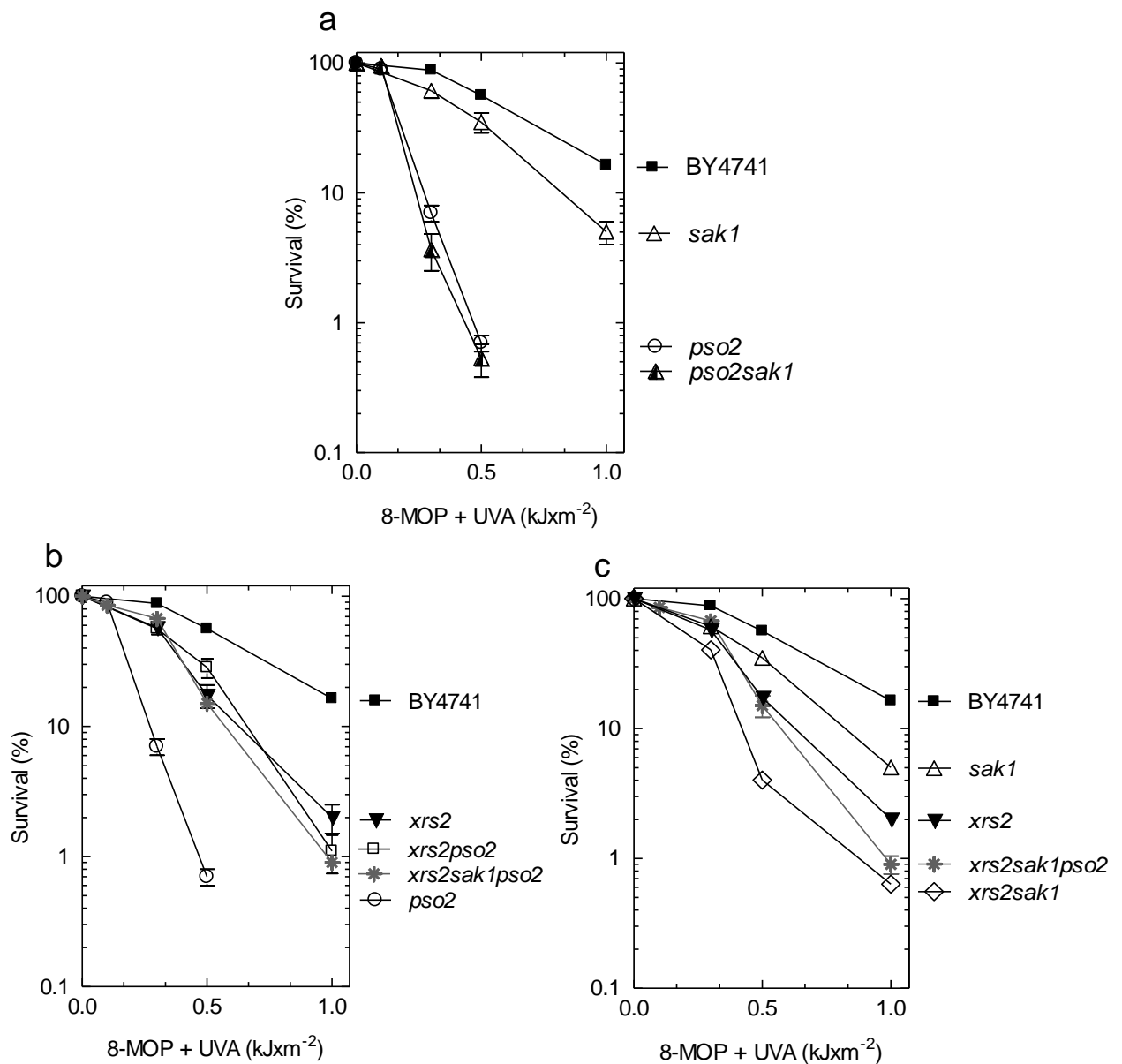
Supplementary Table 1. *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study.

Strain	Relevant genotype	Source
BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; met15Δ0</i>	Euroscarf
<i>pso2Δ</i>	BY4741; with <i>pso2::LEU2</i>	Munari et al. 2012
<i>sak1Δ</i>	BY4741; with <i>sak1::HIS3</i>	Munari et al. 2012
<i>pso2Δsak1Δ</i>	BY4741; with <i>pso2::LEU2; sak1::HIS3</i>	Munari et al. 2012
<i>xrs2Δ</i>	BY4741; with <i>xrs2::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>xrs2Δ pso2Δ</i>	BY4741; with <i>xrs2::kanMX4; pso2::LEU2</i>	this study
<i>xrs2Δsak1Δ</i>	BY4741; with <i>xrs2::kanMX4; sak1::HIS3</i>	this study
<i>xrs2Δ pso2Δsak1Δ</i>	BY4741; with <i>xrs2::kanMX4; pso2::LEU2; sak1::HIS3</i>	this study
<i>tell1Δ</i>	BY4741; with <i>tell1::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>tell1Δ pso2Δ</i>	BY4741; with <i>tell1::kanMX4; pso2::LEU2</i>	this study
BY4742	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ0</i>	Euroscarf
<i>pso2Δ</i>	BY4742; with <i>pso2::URA3</i>	Munari et al. 2012
<i>sak1Δ</i>	BY4742; with <i>sak1::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>pso2Δsak1Δ</i>	BY4742; with <i>sak1::kanMX4; pso2::URA3</i>	Munari et al. 2012
<i>tor1Δ</i>	BY4742; with <i>tor1::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>tor1Δ pso2Δ</i>	BY4742; with <i>tor1::kanMX4; pso2::URA3</i>	this study
<i>rad50Δ</i>	BY4742; with <i>rad50::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>rad50Δ pso2Δ</i>	BY4742; with <i>rad50::kanMX4; pso2::LEU2</i>	Munari et al. 2012
<i>rad50Δ sak1Δ</i>	BY4742; with <i>rad50::kanMX4; sak1::HIS3</i>	this study
<i>rad50Δ pso2Δ sak1Δ</i>	BY4742; with <i>rad50::kanMX4; pso2::LEU2; sak1::HIS3</i>	this study



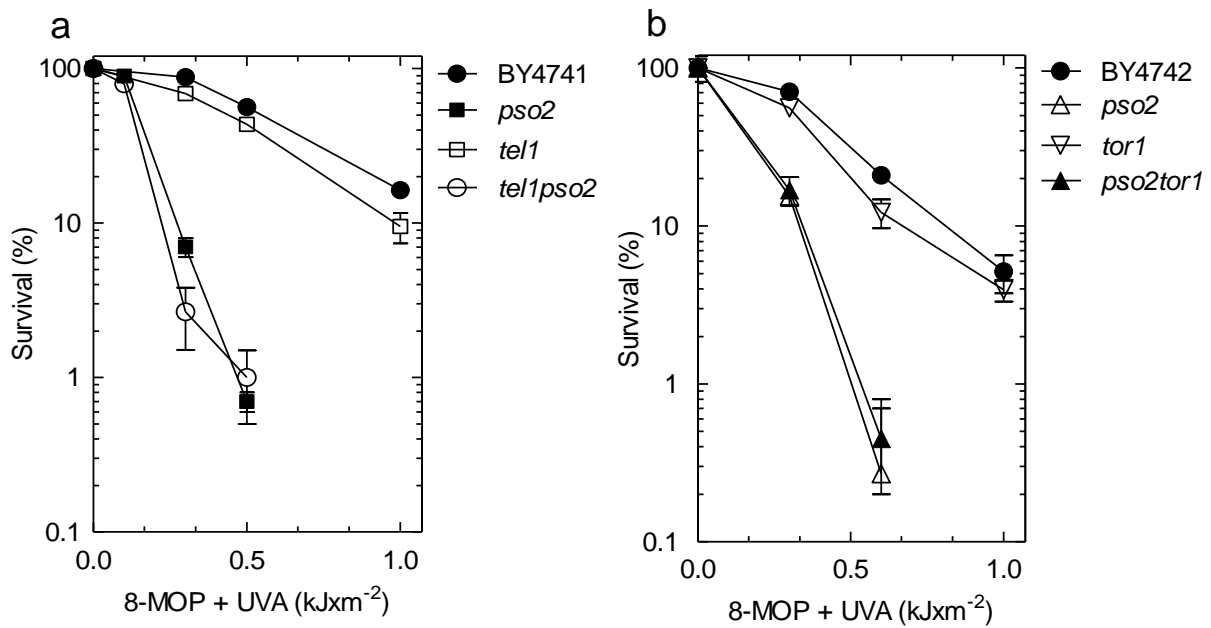
Supplementary Figure 1. Survival of haploid *S. cerevisiae* BY4742 (WT) and isogenic mutants for *PSO2*, *SAK1* and *RAD50* genes after treatment with 8-methoxypsoralen plus UVA. **(a)** single- and double mutants for *PSO2* and *SAK1* genes and triple mutant *pso2Δsak1Δrad50Δ*; **(b)** single- and double mutants for *PSO2* and *RAD50* genes; **(c)** single- and double mutants for *SAK1* and *RAD50* genes. Exponential phase cells were assayed for 8-MOP+UVA sensitivity according to HENRIQUES & MOUSTACCHI (1980). Observing the survival data, it is noted that triple mutation *rad50Δpso2Δsak1Δ* leads to a similar sensitivity in relation to *pso2Δ* and *rad50Δ* single-, *rad50Δpso2Δ* and *pso2Δsak1Δ* double mutations, after exposition to photoactivated 8-MOP. This indicates an

epistatic interaction between *PSO2*, *SAK1* and *RAD50* genes in the repair of DNA lesions induced by 8-MOP+UVA.

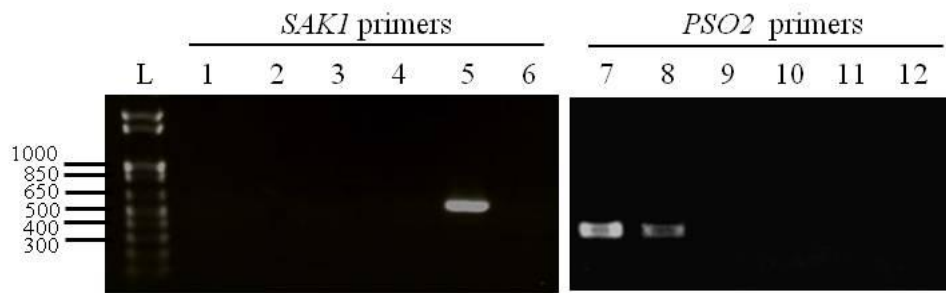


Supplementary Figure 2. Survival of haploid *S. cerevisiae* BY4741 (WT) and isogenic mutants for *PSO2*, *SAK1* and *XRS2* genes after treatment with 8-methoxypsoralen plus UVA. (a) single- and double mutants for *PSO2* and *SAK1* genes; (b) single- and double mutants for *PSO2* and *XRS2* genes and triple mutant *xrs2Δsak1Δpso2Δ*; (c) single- and double mutants for *SAK1* and *XRS2* genes and triple mutant *xrs2Δsak1Δpso2Δ*. Exponential phase cells were assayed for 8-MOP+UVA sensitivity according to HENRIQUES & MOUSTACCHI (1980). Note on survival curve 'b' that the triple mutant *xrs2Δsak1Δpso2Δ* presents a similar sensitivity to single mutant *xrs2Δ* and to double

mutant *xrs2Δpso2Δ* after 8-MOP+UVA treatment. Otherwise, double mutant *xrs2Δpso2Δ* appears to be less sensitive to the treatment than the single mutant *pso2Δ*. This indicates an epistatic interaction between *PSO2* and *XRS2* genes, and it is likely that the mutation in both genes is recovering part of the sensitivity for *pso2* mutation alone. On the other hand, survival curve 'c' clearly shows that double mutant *xrs2Δsak1Δ* is more sensitive than the single mutants in an additive mode. These results indicate a non-epistatic interaction between *XRS2* and *SAK1* genes, indicating that they act on different substrates in distinct repair pathways for 8-MOP+UVA-induced lesions.



Supplementary Figure 3. Survival of haploid *S. cerevisiae* and isogenic single and double mutants for (a) *PSO2* and *TEL1* and (b) *PSO2* and *TOR1* genes, after treatment with 8-methoxypsoralen plus UVA. Exponential phase cells were assayed for 8-MOP+UVA sensitivity according to HENRIQUES & MOUSTACCHI (1980). Survival data on graphic 'a' show that double mutation *pso2Δtel1Δ* renders a sensitive phenotype similar to the single mutation *pso2Δ*, but the single mutant *tel1Δ* does not present a significant sensitivity to 8-MOP+UVA. These results indicate that *PSO2* and *TEL1* genes do not interact genetically for repair of ICLs induced by this treatment. Likewise, *pso2Δ* and *pso2Δtor1Δ* double mutant present a similar sensitivity to 8-MOP+UVA photoaddition, while *tor1Δ* single mutant presents a WT-like sensitivity. These data clearly show that *PSO2* and *TOR1* genes do not interact for repair of 8-MOP photolesions.



Supplementary Figure 4. Results for PCR with *PSO2* and *SAK1* primers to confirm gene disruption by homologous recombination in *S. cerevisiae*. Standard markers are indicated in bp. **Lanes:** L- 1Kb Plus DNA ladder; 1- *rad50Δsak1Δ*; 2- *rad50Δpso2Δsak1Δ*; 3- *xrs2Δsak1Δ*; 4- *xrs2Δpso2Δsak1Δ*; 5- positive control – BY4742 strain; 6- negative control; 7- positive control – BY4742 strain; 8- positive control – BY4741 strain; 9- *rad50Δpso2Δ*; 10- *xrs2Δpso2Δ*; 11- *tell1Δpso2Δ*; 12- negative control. The amplicon with approximately 633bp observed for *PAK1* primers, and the amplicon with approximately 347bp detected for *PSO2* primers are in accordance with the expected size (Munari et al. unpublished data). Thus, these data show that gene disruption occurred successfully, since no amplicon were detected for transformants strains.

Supplementary References

1. HENRIQUES, J. A. P. & MOUSTACCHI, E. Isolation and characterization of *pso* mutants sensitive to photo-addition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 95(2): 273–288, 1980.
2. MUNARI, F. M.; REVERS, L. F.; CARDONE, J. M.; IMMICH, B. F.; MOURA, D. J.; GUECHEVA, T. N.; BONATTO, D.; SAFFI, J.; BRENDDEL, M.; HENRIQUES, J. A. P. Sak1 Kinase Contributes to Pso2 Nuclease in Repair of DNA Damage Induced by Interstrand Crosslink-Inducing Agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, submitted manuscript, 2012.

Discussão Geral

1. Discussão geral

As ICLs representam uma forma extremamente tóxica de dano genômico, devido à sua capacidade de inibir processos celulares básicos como a transcrição e a replicação (DRONKERT & KANAAR, 2001; LEHOCKKY *et al.*, 2007; WARD *et al.*, 2012). A reparação de ICLs em eucariotos ainda é relativamente pouco compreendida, embora uma etapa inicial de incisão da ICL pelas endonucleases da via NER, seguida de reparação por HR e TLS tenham sido descritas em estudos genéticos (HENRIQUES & MOUSTACCHI, 1981; JACHYMCZYK *et al.*, 1981; MCHUGH *et al.*, 2000). A resolução de ICLs pode levar à formação de DSBs no DNA que, se não forem corretamente reparadas, podem ocasionar eventos mutagênicos como perda de cromossomos, deleções, duplicações ou translocações, que podem levar à morte celular (MIMITOU & SYMINGTON, 2010).

Devido aos efeitos genotóxicos que as ICLs podem causar, agentes indutores dessas lesões são amplamente utilizados em tratamentos contra o câncer. Agentes ambientais e endógenos também podem levar à formação de ICLs, o que fez com que mecanismos de reparação ou tolerância a esses danos fossem selecionados ao longo da evolução (WOOD, 2010). Paradoxalmente, estes mecanismos também são responsáveis pelo surgimento de resistência a drogas quimioterápicas em células tumorais (HO & SCHÄRER, 2010). Assim, a compreensão detalhada dos mecanismos de reparação de ICLs torna-se extremamente relevante, pelo seu potencial em auxiliar no desenvolvimento de novas drogas e na elaboração de protocolos de tratamentos mais eficazes contra o câncer.

A manutenção da integridade genômica abrange vários processos biológicos que incluem a replicação e a reparação do DNA, juntamente com as vias sinalizadoras que coordenam o metabolismo do DNA com a progressão do ciclo celular (HUANG & KOLODNER, 2005). Entre os mecanismos utilizados pelos eucariotos para a reparação de DSBs resultantes de ICLs encontram-se proteínas das vias de reparação NER, HR, NHEJ, TLS e da via da anemia de Fanconi (revisado em CATTELL *et al.*, 2010; HINZ 2010; HO & SCHÄRER, 2010; LEHOCZKÝ *et al.*, 2007; MCHUGH *et al.*, 2012; VASQUEZ, 2010). Além destas, a proteína Pso2 está envolvida especificamente na reparação de ICLs induzidas por mostardas nitrogenadas, cisplatina e fotoadição de psoralenos bifuncionais (BONATTO *et al.*, 2005; CATTELL *et al.*, 2010; HENRIQUES & MOUSTACCHI, 1980; SIEDE & BRENDDEL, 1981). A escolha da via utilizada para a reparação das DSBs

ocorrerá de acordo com o tipo de extremidade gerada e a fase do ciclo celular (MIMITOU & SYMINGTON, 2010). As extremidades de DNA ‘livres’ são substrato para a rápida ligação do heterodímero Ku (YKu70p/YKu80p), que impede a resecção do DNA e recruta as proteínas necessárias para a via NHEJ, ocorrendo preferencialmente na fase G1 do ciclo celular (MIMITOU & SYMINGTON, 2010). Por outro lado, as CDKs (ciclina dependentes de cinases) regulam a degradação nucleolítica 5’-3’ das extremidades de DNA (resecção), necessária para originar as regiões de fita simples 3’, que serão substratos para a ligação das proteínas seguintes, nas fases S/G2 do ciclo celular (MIMITOU & SYMINGTON, 2008; CEJKA et al., 2010).

O entendimento dos mecanismos de detecção, sinalização e reparação de danos no DNA avançou muito na última década, sendo melhor conhecido no organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Estes mecanismos são, na sua maioria, compartilhados por eucariotos superiores, inclusive humanos (CATTELL et al., 2010). Entretanto, vários aspectos moleculares ainda precisam ser esclarecidos, como a interação entre diferentes proteínas, que leva à sobreposição de vias nos processos de reparação de ICLs (FIEDLER et al., 2009).

Conforme demonstrado no Capítulo 2 desta tese, verificou-se que a cinase Sak1 fosforila Pso2p e que ocorre uma interação epistática entre os mutantes *ps02Δ* e *sak1Δ* após tratamento com 8-MOP+UVA, HN2 e cisplatina. O gene *SAK1* codifica para uma proteína cinase que suprime mutações termo-lábeis causadas pela Pol α , de forma dependente de *RAD9* (HOVLAND et al., 1997), sugerindo seu potencial envolvimento em repostas celulares a danos no DNA. Sak1p também fosforila a cinase Snf1, que desempenha um papel central na regulação de várias atividades celulares de leveduras como, por exemplo, os estágios inicial e final da meiose (HONG et al., 2003; LIU et al., 2011). Estudos demonstraram que o mutante *snf1* é sensível ao estresse genotóxico causado por hidroxipuréia e MMS (HEDBACKER & CARLSON, 2008), e que ocorre aumento significativo na expressão do gene *SAK1* de *S. cerevisiae* após tratamento com 8-MOP+UVA (DARDALHON et al., 2007). O conjunto dessas observações, juntamente com o fato de que a sinalização por grupos fosfato é crítica para a maioria dos processos celulares, torna significativa a identificação pelo método THS de uma cinase interagindo com Pso2p.

Sabe-se que mutantes *pso2* conseguem realizar a incisão das ICLs induzidas por agentes bifuncionais, gerando DSBs cujas extremidades são classificadas como ‘complexas’, pois necessitam de um processamento para se tornarem acessíveis às proteínas seguintes das vias de reparação (MAGAÑA-SCHWENCKE et al., 1982; WILBORN & BRENDEL, 1989; SYMINGTON & GAUTIER, 2011). O complexo MRX (Mre11p-Rad50p-Xrs2p) atua como sensor de DSBs e também controla a resposta a danos no DNA pela ativação da cinase Tel1 (FUKUNAGA et al., 2011; STRACKER & PETRINI, 2011). Tel1p, por sua vez, promove a fosforilação da endonuclease Sae2, que atua no processamento de *hairpins* juntamente com a endonuclease Mre11 (RUPNIK et al., 2010). O complexo Ku liga-se rapidamente às DSBs com extremidades ‘livres’, caracterizadas por apresentarem grupos 3’-hidroxil ou 5’-fosfato, promovendo a reparação pela via NHEJ (WU et al., 2008). A proteína YKu70 está envolvida na manutenção do comprimento dos telômeros e, recentemente, foi relatado que sua regulação negativa é causada pela inibição do complexo TORC1, composto pelas proteínas Tor1 e Tor2 em *S. cerevisiae*. Este complexo desempenha um papel central na resposta à falta de nutrientes e também está envolvido na regulação da meiose (UNGAR et al., 2011).

A partir dessas informações, buscou-se ampliar o entendimento da participação das proteínas Pso2 e Sak1 na reparação de ICLs induzidas por agentes bifuncionais, avaliando o modo de interação de *PSO2* e *SAK1* com os genes *YKU70*, *MRE11*, *XRS2*, *RAD50*, *TEL1* e *TOR1*, que codificam proteínas que atuam na sinalização e no início da reparação de DBSs. Para tanto, foram realizados ensaios de sobrevivência com a combinação de simples, duplos e triplos mutantes de *S. cerevisiae*, expostos a diferentes tratamentos com agentes indutores de ICLs.

Os resultados das interações genéticas observadas neste estudo, sumarizados na Tabela 2, indicam que Pso2p e Sak1p atuam na mesma via de reparação de ICLs na fase exponencial de *S. cerevisiae* (Fig. 2 do Capítulo 2). Por outro lado, o simples mutante *yku70Δ* não apresentou sensibilidade significativa para os tratamentos com 8-MOP+UVA e HN2, enquanto que os duplos mutantes *pso2Δsak1Δ*, *pso2Δyku70Δ* e o triplo mutante *pso2Δsak1Δyku70Δ* apresentam sensibilidade semelhante à *pso2Δ* (Fig. 4 do Capítulo 2), indicando que a proteína YKu70 atua de forma independente de Pso2p e Sak1p na reparação de ICLs. Este resultado, juntamente com o bloqueio para mutagênese induzida por agentes causadores de ICLs observado no mutante *pso2* (CASSIER et al., 1980;

HENRIQUES & BRENDEL, 1990), sugere que a proteína Pso2 pode fornecer substrato para a via alternativa MMEJ, que é uma via de reparação de DNA sujeita a erros (descrita no Capítulo 1). Em mutantes *yku70*, a formação acelerada de DNA de cadeia simples (ss-DNA) é responsável, em parte, pelo aumento na taxa de reparação pela via MMEJ (DECOTTIGNIES, 2007; HART et al., 2007). Esta via é frequentemente associada com anomalias cromossômicas, visto que causa extensas deleções na região de entorno da quebra no DNA (MCVEY & LEE, 2008). MMEJ pode contribuir, por exemplo, com a ocorrência de translocações cromossomais que originam linfomas (NUSSENZWEIG & NUSSENZWEIG, 2007).

Tabela 2. Interações observadas entre os genes *PSO2* e *SAK1* de *S. cerevisiae* com genes de reparação do DNA e de checagem do ciclo celular, após tratamento com diferentes agentes indutores de ICLs.

Genes	Agentes indutores de ICLs	
	8-MOP	HN2
<i>PSO2 – SAK1</i> ⁽¹⁾	EP	EP
<i>PSO2 – RAD50</i> ⁽²⁾	EP	NA
<i>SAK1 – RAD50</i> ⁽²⁾	EP	NA
<i>PSO2 – XRS2</i> ⁽²⁾	EP	NA
<i>SAK1 – XRS2</i> ⁽²⁾	NE-A	NA
<i>PSO2 – MRE11</i> ⁽¹⁾	NE-S	NE-S
<i>SAK1 – MRE11</i> ⁽¹⁾	NE-S	NE-S
<i>PSO2 – YKU70</i> ⁽¹⁾	ND	ND
<i>SAK1 – YKU70</i> ⁽¹⁾	ND	ND
<i>PSO2 – TOR1</i> ⁽²⁾	ND	NA
<i>PSO2 – TEL1</i> ⁽²⁾	ND	NA

EP = interação epistática. NE-S = interação não epistática-sinergismo. NE-A = interação não epistática-aditiva. ND = não detectada interação. NA = não analisada.

⁽¹⁾ Munari et al, 2012 (submetido para publicação, Capítulo 2)

⁽²⁾ Resultados complementares da Tese (Capítulo 3)

Em contrapartida, o mutante *mre11Δ* mostrou-se sensível aos tratamentos com 8-MOP+UVA e HN2, sendo que esta sensibilidade foi cerca de 10× maior para o triplo

mutante *pso2Δsak1Δmre11Δ* em relação ao duplo mutante *pso2Δmre11Δ*, para 8-MOP fotoativado com $0,3 \text{ kJ.m}^{-2}$ de UVA (Fig. 5 do Capítulo 2). Esta interação não epistática observada entre os genes *PSO2* e *SAK1* com *MRE11* indica que as respectivas proteínas atuam em vias diferentes, porém competem pelo mesmo substrato na reparação de ICLs em células de levedura em fase exponencial (Fig. 19, passos 2 e 3). Este resultado está de acordo com um estudo de Lam e colaboradores (LAM et al., 2008), que mostrou que Pso2p foi responsável pelo processamento e abertura de mais de 95% dos *hairpins* completamente fechados em *S. cerevisiae*. Por outro lado, estruturas *hairpin* também podem ser clivadas pelos complexos Mre11p/Rad50p ou MRX cooperativamente com Sae2 (LENGSFELD et al., 2007), sendo que Mre11p atua preferencialmente em *hairpins* formados em regiões de longas repetições invertidas (LOBACHEV et al., 2002), o que explica a interação não epistática entre *PSO2* e *MRE11* observada em nosso experimento (Fig. 5 do Capítulo 2).

A partir destes resultados, sugeriu-se um modelo (Fig. 6 do Capítulo 2) onde uma forquilha de replicação bloqueada por uma ICL leva à extrusão de DNA, formando uma estrutura cruciforme (BRENDDEL et al., 2003; DUDÁS et al., 2007; MAGAÑA-SCHWENCKE et al., 1982). A estrutura cruciforme é clivada por endonucleases (Pso2p+Sak1p ou MRX+Sae2p), resultando na formação de DSBs cujas extremidades são protegidas por uma estrutura do tipo *hairpin* completamente fechado, que não é substrato para Mre11p (LAM et al., 2008). Assim, a abertura desse *hairpin* é realizada pela atividade endonucleásica de Pso2p (TIEFENBACH & JUNOP, 2012) ativada pela cinase Sak1, deixando as extremidades da DSB acessíveis para processamento. A presença da proteína YKu70 (formando o complexo Ku) protege as extremidades da DSB da resecção e recruta os fatores da via NHEJ (quando as extremidades da DSB são compatíveis), enquanto que a presença do complexo MRX juntamente com a endonuclease Sae2 direciona a reparação para a via HR (dependente da exonuclease Exo1) ou para a via MMEJ (dependente da helicase Sgs1 e da helicase/endonuclease Dna2), de acordo com a fase do ciclo celular (LAM et al., 2008; MIMITOU & SYMINGTON, 2010). Pso2 também pode atuar nas estruturas intermediárias geradas pela incisão inicial das ICLs pelas proteínas do NER, fazendo a resecção das mesmas com sua atividade 5'-exonuclease de Pso2p (LEHOCZKÝ et al., 2007; MAGAÑA-SCHWENCKE et al., 1982).

Somando-se a este modelo os resultados complementares deste trabalho, foi possível ampliar a visão da atuação da proteína Pso2 na reparação de ICLs, conforme apresentado na Figura 19. Os resultados de sobrevivência ao tratamento com 8-MOP+UVA para o mutante *rad50Δ* mostraram sensibilidade equivalente ao simples mutante *pso2Δ*, ao duplo mutante *pso2Δrad50Δ* e ao triplo mutante *pso2Δrad50Δsak1Δ* (Fig. 1 do Capítulo 3), indicando interação epistática entre os genes *PSO2*, *SAK1* e *RAD50* na reparação de ICLs em fase exponencial de *S. cerevisiae*. Analisando estes resultados, em contrapartida com a interação não epistática com o gene *MRE11*, pode-se concluir que as proteínas Pso2, Sak1 e Rad50 estão atuando em etapas sequenciais da mesma via de reparação de ICLs, enquanto que Mre11 atua numa via paralela (Fig. 19, passos 2, 3, 4). Sabe-se que a proteína Rad50 pode desempenhar diferentes funções nas extremidades das DSBs (D'AMOURS & JACKSON, 2002). Deste modo, Rad50p poderia estar exercendo a função de manter as extremidades das DSBs próximas após o processamento e abertura dos *hairpins* por Pso2p e Sak1p, enquanto as exonucleases realizam a resecção necessária para expor as regiões de homologia.

Por outro lado, o mutante *xrs2Δsak1Δ* apresentou sensibilidade aditiva em relação aos simples mutantes, indicando interação não epistática entre os genes *SAK1* e *XRS2*. Adicionalmente, o mutante simples *xrs2Δ* apresentou sensibilidade semelhante ao duplo mutante *pso2Δxrs2Δ* e ao triplo mutante *pso2Δxrs2Δsak1Δ* após tratamento com os agentes indutores de ICLs, indicando interação epistática entre os genes *PSO2* e *XRS2*. Porém, esta sensibilidade foi menor do que a observada para o simples mutante *pso2Δ* (Fig. 2 do Capítulo 3). Este resultado observado, de que a interrupção do gene *XRS2* recuperou parte da sensibilidade da mutação em *PSO2*, foi inesperado. Cabe salientar que a interrupção dos genes foi confirmada por PCR, com oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para a região interna dos genes *PSO2* e *SAK1* (Fig. 4 do Capítulo 3). Este resultado sugere que Pso2p e Xrs2p participam da mesma via de reparação de ICLs em fase exponencial de leveduras, sendo que Xrs2p atua num passo anterior a Pso2p. Possivelmente, na ausência de Xrs2p o substrato é desviado para uma via alternativa (sem o envolvimento de Pso2p). A ausência da proteína Xrs2 funcional impede o recrutamento de Mre11p e Rad50p para formar o complexo MRX, bem como o recrutamento de Tel1p para o sítio da DSB (D'AMOURS & JACKSON, 2001; UNGAR et al., 2011).

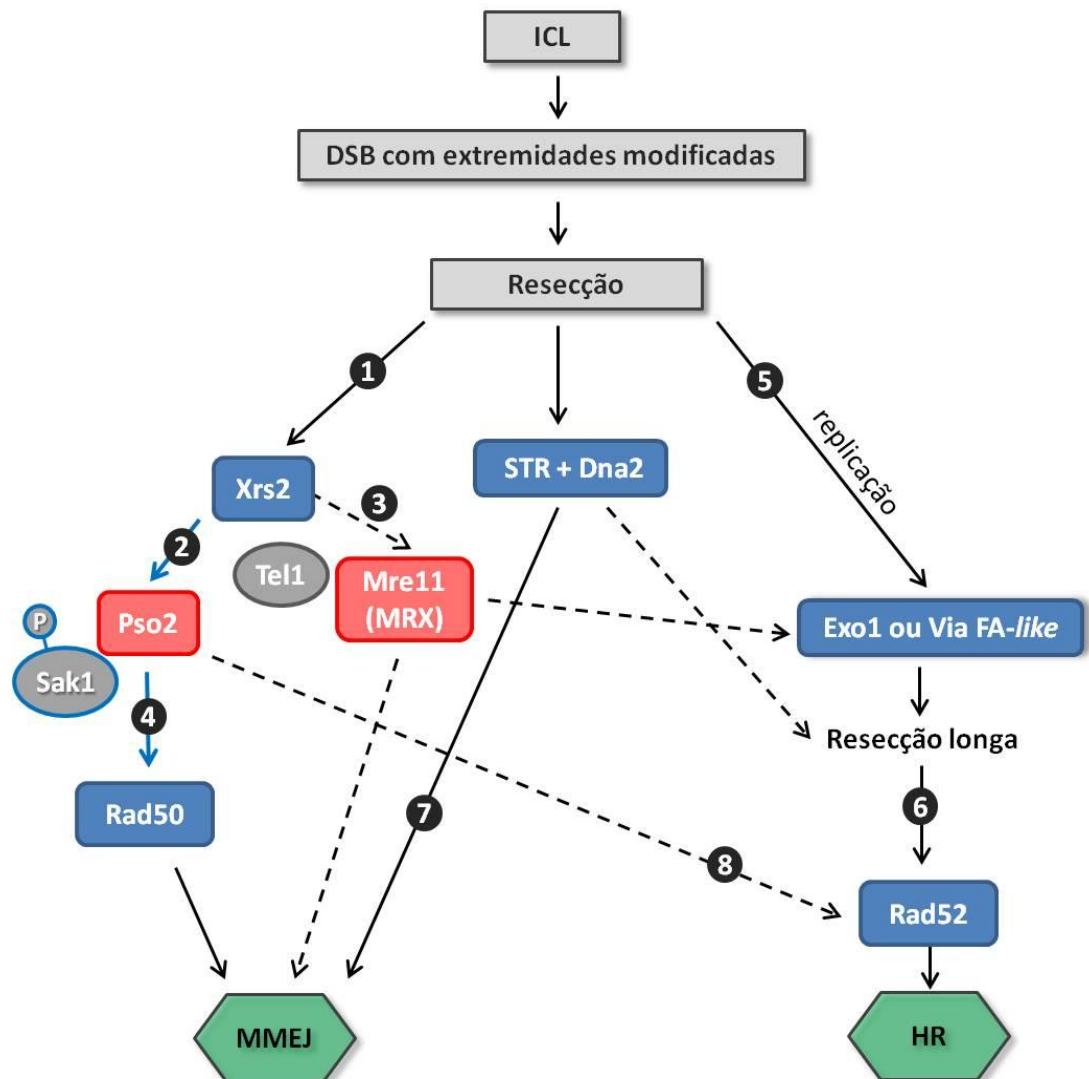


Figura 1. Modelo para a atuação da nuclese Pso2 na reparação de quebras duplas induzidas por pontes intercadeia no DNA.

- 1- Função individual de Xrs2p na sinalização da DSB, que torna a lesão acessível.
- 2- Xrs2p encaminha o processamento da DSB para a via com participação do Pso2p.
- 3- *PSO2* e *MRE11* têm interação não epistática, atuando em vias diferentes.
- 4- *PSO2*, *RAD50* e *SAK1* são epistáticos, atuando na mesma via.
- 5- Na ausência de Pso2p ou Xrs2p, o substrato é encaminhado para ressecção por Exo1p ou para a via *FA-like*.

- 6- *PSO2* e *RAD52* apresentam interação não epistática na fase estacionária, indicando que atuam em vias diferentes.
- 7- Complexo STR (Sgs1p/Top3p/Rmi1p) + Dna2p encaminham o substrato para a via MMEJ, que resulta em inserções e deleções, ou para resecção longa.
- 8- Pso2p está envolvida na reparação por HR de ICLs que levam ao colapso da forquilha de replicação (fase S do ciclo celular).

Recentemente, foi descrito que Xrs2p atua na ativação do *checkpoint* de recombinação em resposta a DSBs não processadas, na mesma via de epistasia que Tel1p (HO & BURGESS, 2011). Dessa forma, sugere-se que Xrs2p pode estar desempenhando uma função independente do complexo MRX, atuando na sinalização da lesão e direcionando a reparação da DSB para a via dependente de Pso2p (Fig. 19, passo 1). Na ausência de Pso2p, a reparação é direcionada para a via semelhante à Anemia de Fanconi (*FA-like*; descrita no Capítulo 1), recentemente identificada em *S. cerevisiae* para a reparação de danos no DNA na fase S do ciclo celular (Fig. 19, passo 5) (DAEE et al., 2012; MCHUGH et al., 2012; WARD et al., 2012). Neste caso, o bloqueio da forquilha de replicação pela ICL ativa a proteína Rad5, levando à poli-ubiquitinação de PCNA, que recruta Mph1 (FANCM em humanos) para o sítio da lesão (Fig. 19, passo 10). Mph1p atua na estabilização ou regressão da forquilha bloqueada, e fatores acessórios promovem a proteção e estabilização da estrutura intermediária formada. Proteínas do complexo MutS α (Msh2-Msh6) também participam desta via, possivelmente como sensoras da estrutura anômala formada na forquilha de replicação. A 5'-exonuclease Exo1 faz a resecção necessária, produzindo substrato para o passo seguinte, que consiste no preenchimento das lacunas com as bases adequadas, feito pela TLS, para a posterior retomada da replicação do DNA pela HR (MCHUGH et al., 2012).

Em contrapartida, verificou-se que os mutantes *tell1 Δ* e *tor1 Δ* não apresentaram sensibilidade significativa após tratamento com 8-MOP fotoativado, indicando claramente que a sensibilidade observada para os duplos mutantes *pso2 Δ tell1 Δ* e *pso2 Δ tor1 Δ* é resultante apenas da interrupção do gene *PSO2*, não havendo interação genética com *TELL1* e *TOR1* (Fig. 3 do Capítulo 3). Visto que a cinase Tel1 não é fundamental para a sinalização ou regulação das vias de reparação do DNA em leveduras, em contraste com a

necessidade da proteína homóloga ATM em mamíferos (FUKUNAGA et al., 2011), justifica-se o fenótipo não sensível apresentado pelo mutante *tell1Δ* neste trabalho. Os genes *TOR1* e *TOR2* de *S. cerevisiae* foram identificados em mutações que conferem resistência ao imunossupressor rapamicina (HELLIWELL et al., 1994), e estão envolvidos em respostas celulares a danos no DNA e a alterações na disponibilidade de nutrientes (LIMSON & SWEDER, 2010). O gene *TOR1* não é essencial em *S. cerevisiae*, mas a interrupção dupla *TOR1/TOR2* causa parada no ciclo celular (G1), assim como o efeito da exposição à rapamicina (HELLIWELL et al., 1994). Em estudo recente, foi observado que a rapamicina pode inibir a reparação do DNA em mutantes *tor1* de *S. cerevisiae* (LIMSON & SWEDER, 2010). Esta constatação indica que as cinases Tor1 e Tor2 não estão envolvidas na regulação destes processos, corroborando nosso resultado para a falta de sensibilidade do mutante *tor1Δ* ao tratamento com 8-MOP fotoativado.

O melhor entendimento da interação da proteína Pso2 com outras proteínas envolvidas na resposta a lesões do tipo ICL, como o complexo MRX, assim como a compreensão dos mecanismos que ativam as diferentes vias de reparação, são de grande importância se considerarmos que algumas células tumorais desenvolveram resistência aos agentes quimioterápicos, principalmente porque se tornam capazes de reparar ICLs. Dessa forma, o uso concomitante do quimioterápico com tratamentos que inativem ou diminuam a expressão de algum gene com função conhecida na reparação de ICLs proporcionaria um tratamento mais eficaz para muitos tipos de tumores. Como exemplo, pode-se citar o silenciamento da proteína Rad50, recentemente utilizado como estratégia para melhorar as repostas à cisplatina em carcinoma de células escamosas (ABUZEID et al., 2009).

A levedura *S. cerevisiae* desempenhou importante papel nos estudos iniciais para a identificação dos genes envolvidos no complexo processo da reparação do DNA (BOTSTEIN & FINK, 2011; MATUO et al., 2012). Como se pode ver a partir dos estudos realizados ao longo das últimas 4 décadas, este eucarioto unicelular ainda representa um modelo de estudo com muito potencial para auxiliar a desvendar os mecanismos de reparação e tolerância aos danos no DNA, gerando conhecimento de base que serve como ponto de partida para avançar nos estudos com modelos mais complexos.

Conclusões

1. Conclusão geral

Os resultados deste trabalho mostram que a cinase Sak1 é importante para a atuação da nuclease Pso2 na reparação de quebras duplas no DNA, formadas após a exposição de *Saccharomyces cerevisiae* a agentes indutores de ICLs, principalmente ao 8-metoxipsoraleno fotoativado e à mostarda nitrogenada. Esta interação com Sak1 possivelmente seja necessária para ativar a função endonucleásica da proteína Pso2. Os ensaios de sobrevivência realizados com simples, duplos e triplos mutantes para os genes *PSO2* e *SAK1*, juntamente com outros genes de reparação e sinalização de danos no DNA, após tratamento com diferentes agentes indutores de ICLs, permitiu a construção de um modelo que amplia a caracterização da atuação de Pso2p na reparação de quebras duplas do DNA com extremidades complexas.

1.1 Conclusões específicas

- A cinase Sak1 interage com a nuclease Pso2, sendo que o domínio conservado β -CASP de Pso2 é necessário para esta interação.
- Ocorre interação epistática entre os genes *PSO2* e *SAK1* após tratamento com 8-MOP+UVA, HN2 e cisplatina, indicando que as respectivas proteínas atuam na mesma via de reparação de ICLs em *S. cerevisiae*, em fase exponencial de crescimento.
- Pso2p é fosforilada pela cinase Sak1 *in vitro*.
- O gene *YKU70* não apresenta interação genética com *PSO2* e *SAK1* após tratamento com 8-MOP+UVA e HN2, mostrando que a proteína YKu70 atua de forma independente das proteínas Pso2 e Sak1 na reparação de DSBs em *S. cerevisiae*.
- O gene *MRE11* apresenta interação não epistática com *PSO2* e *SAK1* após tratamento com 8-MOP+UVA e HN2, indicando que a proteína Mre11 atua no mesmo tipo de substrato, porém numa via diferente das proteínas Pso2 e Sak1, na reparação de ICLs em fase exponencial de *S. cerevisiae*.
- O gene *RAD50* tem interação epistática com *PSO2* e *SAK1* após tratamento com 8-MOP+UVA, apontando para a participação das proteínas Rad50, Pso2 e Sak1 na mesma via para a reparação de ICLs, em fase exponencial de *S. cerevisiae*.

- O gene *XRS2* interage de forma não epistática com *SAK1* após tratamento com 8-MOP+UVA, mostrando que as proteínas Xrs2 e Sak1 atuam em vias e substratos diferentes durante a reparação de ICLs em fase exponencial de *S. cerevisiae*.
- Os genes *XRS2* e *PSO2* apresentam interação epistática após tratamento com 8-MOP+UVA, sendo que a interrupção de *XRS2* recupera parte da sensibilidade do mutante *pso2Δ*, indicando que as proteínas Xrs2 e Pso2 atuam na mesma via de reparação de ICLs na fase exponencial de *S. cerevisiae*, com a atividade de Xrs2p precedendo Pso2p.
- Os genes *TEL1* e *TOR1* não interagem geneticamente com *PSO2* após tratamento com 8-MOP+UVA, mostrando que as cinases Tel1 e Tor1 não participam da sinalização para a reparação de ICLs na via que inclui a nuclease Pso2.

Perspectivas

PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, propõem-se as seguintes perspectivas para continuidade deste estudo:

- Realizar ensaios de co-imunoprecipitação com extratos de proteínas totais de linhagens proficientes e deficientes para as proteínas Pso2 e Sak1 de *S. cerevisiae*, após tratamento com agentes indutores de ICLs (como, por exemplo, o 8-MOP fotoativado), a fim de confirmar a interação física destas proteínas.
- Investigar aspectos da fosforilação de Pso2 pela cinase Sak1, verificada neste trabalho, através de ensaios de fosforilação *in vivo*, após tratamento das células com diferentes agentes indutores de ICLs no DNA.
- Identificar a localização subcelular de Pso2p e das possíveis proteínas interativas *in situ*, antes e após tratamentos com agentes causadores de lesões no DNA.

Referências bibliográficas

Referências bibliográficas

1. ABUZEID, W. M.; JIANG, X.; SHI, G.; WANG, H.; PAULSON, D.; ARAKI, K.; JUNGREIS, D.; CARNEY, J.; BERT JR, W. O.; LI, D. Molecular disruption of RAD50 sensitizes human tumor cells to cisplatin-based chemotherapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(7): 1974-1985, 2009.
2. AJIMURA, M.; LEEM, S.H.; OGAWA, H. Identification of new genes required for meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 133: 51–66, 1993.
3. ALMEIDA, B.; SILVA, A.; MESQUITA, A.; SAMPAIO-MARQUES, B.; RODRIGUES, F.; LUDOVICO, P. Drug-induced apoptosis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783: 1436–1448, 2008.
4. ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, 28(1): 118–129, 2005.
5. ARAÚJO, S.J. & WOOD, R.D. Protein complexes in nucleotide excision repair. *Mutation Research*, 435(1): 23–33, 1999.
6. ATAIAN, Y.; KREBS, J. E. Five repair pathways in one context: chromatin modification during DNA repair. *Biochemistry and Cell Biology*, 84:490–504, 2006.
7. AYLON, Y.; LIEFSHITZ, B.; KUPIEC, M. The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *The EMBO journal*, 23(24): 4868-4875, 2004.
8. BANDYOPADHYAY, S.; MEHTA, M.; KUO, D.; SUNG, M.; CHUANG, R.; JAEHNIG, E. J.; BODENMILLER, B.; LICON, K.; COPELAND, W.; SHALES, M.; FIEDLER, D.; DUTKOWSKI, J.; GUÉNOLÉ, A.; VAN ATTIKUM, H.; SHOKAT, K. M.; KOLODNER, R. D.; HUH, W. K.; AEBERSOLD, R.; KEOGH, M.; KROGAN, N. J.; IDEKER, T. Rewiring of genetic networks in response to DNA damage. *Science*, 330: 1385–1389, 2010.
9. BARBER, L.J.; WARD, T. A.; HARTLEY, J. A.; MCHUGH, P. J. DNA interstrand cross-link repair in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle : Overlapping roles for *PSO2* (*SNM1*) with MutS factors and *EXO1* during S phase. *Molecular and Cellular Biology*, 25(6): 2297–2309, 2005.
10. BARR, M.M. Super models. *Physiological Genomics*, 13(1): 15-24, 2003.
11. BETHEA, D.; FULLMER, B.; SYED, S.; SELTZER, G.; TIANO, J.; RISCHKO, C.; GILLESPIE, L.; BROWN, D.; GASPARRO, F. P. Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. *Journal of Dermatological Science*, 19(2): 78–88, 1999.
12. BOITEUX, S. & GUILLET, M. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*, 3(1):1-12, 2004.

13. BONATTO, D.; REVERS, L. F.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J. A. P. The eukaryotic Pso2/Snm1/Artemis proteins and their function as genomic and cellular caretakers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(3), 321-334, 2005.
14. BOTSTEIN, D. & FINK, G.R. Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics*, 189(3): 695–704, 2011.
15. BOTSTEIN, D. & FINK, G.R. Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science*, 1(240): 1439–1443, 1988.
16. BOULIKAS, T. & VOUGIOUKA, M. Recent clinical trials using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs. *Oncology Reports*, 11: 559–595, 2004.
17. BRENDEL, M. & HAYNES, R.H. Interactions among genes controlling sensitivity to radiation and alkylation in yeast. *Molecular & General Genetics*, 125(3): 197–216, 1973.
18. BRENDEL, M. & HENRIQUES, J. A. P. The pso mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. *Mutation Research*, 489(1): 79–96, 2001.
19. BRENDEL, M.; BONATTO, D.; STRAUSS, M.; REVERS, L. F.; PUNGARTNIK, C.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P. Role of *PSO* genes in repair of DNA damage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, 544: 179-193, 2003.
20. BRENDEL, M.; MARISCO, G.; GANDA, I.; WOLTER, R.; PUNGARTNIK, C. DNA repair mutant *pso2* of *Saccharomyces cerevisiae* is sensitive to intracellular acetaldehyde accumulated by disulfiram-mediated inhibition of acetaldehyde dehydrogenase. *Genetics and Molecular Research*, 9(1): 48–57, 2010.
21. CALLEBAUT, I.; MOSHOUS, D.; MORNON, J.-P.; DE VILLARTAY, J.-P. Metallo-beta-lactamase fold within nucleic acids processing enzymes: the beta-CASP family. *Nucleic acids research*, 30(16): 3592–3601, 2002.
22. CARNEY, J. P.; MASER, R. S.; OLIVARES, H.; DAVIS, E. M.; LE BEAU, M.; YATES JR III; HAYS, L.; MORGAN, W. F.; PETRINI, J. H. J. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell*, 93: 477-486, 1998.
23. CASSIER, C.; CHANET, R.; HENRIQUES, J. A. P.; MOUSTACCHI, E. The effects of three *PSO* genes on induced mutagenesis: a novel class of mutationally defective yeast. *Genetics*, 96: 841-857, 1980.
24. CATTELL; SENGEROVÁ, B.; MCHUGH, P. J. The SNM1/Pso2 family of ICL repair nucleases: from yeast to man. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51(6): 635-645, 2010.
25. CAULFIELD, J.L.; WISHNOK, J.S.; TANNEMBAUM, S.R. Nitric oxide-induced interstrand cross-links in DNA. *Chemical Research in Toxicology*, 15(5): 571–574, 2003.

26. CEJKA, P.; CANNAVO, E.; POLACZEK, P.; MASUDA-SASA, T.; POKHAREL, S.; CAMPBELL, J. L.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2. *Nature*, 467(7311): 112–116, 2010.
27. CHANEY, S. G. & SANCAR, A. DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *Journal of the National Cancer Institute*, 88: 1346–1360, 1996.
28. COUVÉ-PRIVAT, S.; MACÉ, G.; ROSSELLI, F.; SAPARBAEV, M. K. Psoralen-induced DNA adducts are substrates for the base excision repair pathway in human cells. *Nucleic Acids Research*, 35(17): 5672–5682, 2007.
29. COUVÉ-PRIVAT, S.; MACÉ-AIMÉ, G.; ROSSELLI, F.; SAPARBAEV, M. K. The human oxidative DNA glycosylase NEIL1 excises psoralen-induced interstrand DNA cross-links in a three-stranded DNA structure. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(18): 11963–11970, 2009.
30. D'AMOURS, D. & JACKSON, S. P. The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation. *Genes & Development*, 15: 2238-2249, 2001.
31. D'AMOURS, D. & JACKSON, S. P. The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nature reviews. Molecular and Cellular Biology*, 3(5): 317-327, 2002.
32. DAEE, D. L.; FERRARI, E.; LONGERICH, S.; ZHENG, X. F.; XUE, X.; BRANZEI, D.; SUNG, P.; MYUNG, K. Rad5-dependent DNA repair functions of the *Saccharomyces cerevisiae* FANCM protein homolog Mph1. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(32): 26563-26575, 2012.
33. DARDALHON, M.; LIN, W.; NICOLAS, A.; AVERBECK, D. Specific transcriptional responses induced by 8-methoxypsoralen and UVA in yeast. *FEMS Yeast Research*, 7(6): 866-878, 2007.
34. DE SILVA, I. U.; MCHUGH, P. J.; CLINGEN, P. H.; HARTLEY, J. A. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, 20(21): 7980-7990, 2000.
35. DE VILLARTAY, J.-P.; SHIMAZAKI, N.; CHARBONNIER, J.-B.; FISCHER, A.; MORNON, J.-P.; LIEBER, M. R.; CALLEBAUT, I. A histidine in the beta-CASP domain of Artemis is critical for its full *in vitro* and *in vivo* functions. *DNA repair*, 8(2): 202–208, 2009.
36. DECOTTIGNIES, A. Microhomology-mediated end joining in fission yeast is repressed by *pku70* and relies on genes involved in homologous recombination. *Genetics*, 176: 1403–1415, 2007.
37. DRONKERT, M.L.G. & KANAAR, R. Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutation Research*, 486(4): 217–247, 2001.

38. DUDÁS, A.; VLASÁKOVÁ, D.; DUDÁSOVÁ, Z.; GABCOVÁ, D.; BROZMANOVÁ, J.; CHOVANEC, M. Further characterization of the role of Pso2 in the repair of DNA interstrand cross-link-associated double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Neoplasma*, 54(3): 189-194, 2007.
39. DZIKIEWICZ-KRAWCZYK, A. The importance of making ends meet: mutations in genes and altered expression of proteins of the MRN complex and cancer. *Mutation Research*, 659: 262–273, 2008.
40. ENGIN, B. & OGUZ, O. Evaluation of time-dependent response to psoralen plus UVA (PUVA) treatment with topical 8-methoxypsoralen (8-MOP) gel in palmoplantar dermatoses. *International Journal of Dermatology*, 44: 337–339, 2005.
41. FIEDLER, D.; BRABERG, H.; MEHTA, M.; CHECHIK, G.; MUKHERJEE, P.; SILVA, A. C.; SHALES, M.; COLLINS, S. R.; WAGENINGEN, S. V.; KEMMEREN, P.; HOLSTEGE, F. C. P.; WEISSMAN, S.; KEOGH, M. C.; KOLLER, D.; SHOKAT, K. M.; KROGAN, N. J. Functional organization of the *S. cerevisiae* phosphorylation network. *Cell*, 136(5): 952–963, 2009.
42. FISHEL, R.; LESCOE, M. K.; RAO, M. R.; COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A.; GARBER, J.; KANE, M.; KOLODNER, R. The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, 75: 1027–1038, 1993.
43. FRIEDBERG, E. C. Deoxyribonucleic acid repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 52: 70–102, 1988.
44. FRIEDBERG, E. C. DNA damage and repair. *Nature*, 421: 436–440, 2003.
45. 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.
46. FUKUNAGA, K.; KWON, Y.; SUNG, P.; SUGIMOTO, K. Activation of protein kinase Tel1 through recognition of protein-bound DNA ends. *Molecular and Cellular Biology*, 31(10): 1959-1971, 2011.
47. FURUSE, M.; NAGASE, Y.; TSUBOUCHI, H.; MURAKAMI-MUROFUSHI, K.; SHIBATA, T.; OHTA, K. Distinct roles of two separable in vitro activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination. *The WMO Journal*, 17: 6412–6425, 1998.
48. GAME, J. C.; COX, B.S. Allelism tests of mutants affecting sensitivity to radiation in yeast and a proposed nomenclature. *Mutation Research*, 12: 328–331, 1971.
49. GAME, J.C.; MORTIMER, R.K. A genetic study of x-ray sensitive mutants in yeast. *Mutation Research*. **24**: 281–292, 1974.
50. GAN, G.N.; WITTSCHIEBEN, J. P.; WITTSCHIEBEN, B. Ø.; WOOD, R. D. DNA polymerase zeta (pol ζ) in higher eukaryotes. *Cell Research*, 18(1): 174–83, 2008.

51. GANGAVARAPU, V.; HARACSKA, L.; UNK, I.; JOHNSON, R. E.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Mms2-Ubc13-dependent and -independent roles of Rad5 ubiquitin ligase in postreplication repair and translesion DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 26(20): 7783–90, 2006.
52. 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: 864–882, 2007.
53. GOFFEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. Life with 6000 Genes. *Science*, 274: 546–567, 1996.
54. GROSSMANN, K.F.; WARD, A.M.; MOSES, R.E. *Saccharomyces cerevisiae* lacking Snm1, Rev3 or Rad51 have a normal S-phase but arrest permanently in G2 after cisplatin treatment. *Mutation Research*, 461(1): 1–13, 2000.
55. HADDAD, R.; TISHLER, R.B.; NORRIS, C.M.; MAHADEVAN, A.; BUSSE, P.; WIRTH, L.; GOGUEN, L. A.; SULLIVAN, C. A.; COSTELLO, R.; CASE, M. A.; POSNER, M. R. Docetaxel, cisplatin, 5-fluorouracil (TPF)-based induction chemotherapy for head and neck cancer and the case for sequential, combined-modality treatment. *The Oncologist*, 8: 35–44, 2003.
56. HART, G. T.; LEE, I.; MARCOTTE, E. R. A high-accuracy consensus map of yeast protein complexes reveals modular nature of gene essentiality. *BMC Bioinformatics*, 8: 236, 2007.
57. HAZRATI, A.; RAMIS-CASTELLTORT, M.; SARKAR, S.; BARBER, L. J.; SCHOFIELD, C. J.; HARTLEY, J. A.; MCHUGH, P. J. Human SNM1A suppresses the DNA repair defects of yeast *pso2* mutants. *DNA Repair*, 7(2): 230–238, 2008.
58. HEDBACKER, K. & CARLSON, M. SNF1/AMPK pathways in yeast. *Frontiers in Biosciences*, 13: 2408–2420, 2008.
59. HEFFERIN, M. L.; TOMKINSON, A.E. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining, *DNA Repair*, 4: 639–648, 2005.
60. HELLIWELL, S. B.; WAGNER, P.; KUNZ, J.; DEUTER-REINHARD, M.; HENRIQUEZ, R.; HALL, M. N. *TOR1* and *TOR2* are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 5(1): 105-118, 1994.
61. HENRIQUES, J. A. P. & MOUSTACCHI, E. Isolation and characterization of *pso* mutants sensitive to photo-addition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 95(2): 273-88, 1980.

62. HENRIQUES, J. A. P. & MOUSTACCHI, E. Interactions between mutations for sensitivity to psoralen photoaddition (*psa*) and to radiation (*rad*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 148(1): 248–56, 1981.
63. HENRIQUES, J. A. P. & BRENDDEL, M. The role of *PSO* and *SNM* genes in DNA repair of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 18(5): 387-393, 1990.
64. HENRIQUES, J. A. P.; BROZMANOVA, J.; BRENDDEL, M. Role of *PSO* genes in the repair of photoinduced interstrand cross-links and photooxidative damage in the DNA of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 39(3): 185-196, 1997.
65. HINZ, J. M. Role of homologous recombination in DNA interstrand crosslink repair. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51: 582-603, 2010.
66. HO, H.-C. & BURGESS, S. M. Pch2 acts through Xrs2 and Tel1/ATM to modulate interhomolog bias and checkpoint function during meiosis. *PLoS Genetics*, 7(11): e1002351, 2011.
67. HO, T. V & SCHÄRER, O. D. Translesion DNA synthesis polymerase in DNA interstrand crosslink repair. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51: 552-566, 2010.
68. HOCH, N. C.; SANTOS, R. S.; ROSA, R. M.; MACHADO, R. M.; SAFFI, J.; BRENDDEL, M.; HENRIQUES, J. A. P. Allelism of *Saccharomyces cerevisiae* gene *PSO10*, involved in error-prone repair of psoralen-induced DNA damage, with SUMO ligase-encoding *MMS21*. *Current genetics*, 53(6): 361–371, 2008.
69. HONG, S.-P.; LEIPER, F. C.; WOODS, A.; CARLING, D.; CARLSON, M. Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100(15): 8839-8843, 2003.
70. HOVLAND, P. G.; TECKLENBERG, M.; SCLAFANI, R. A. Overexpression of the protein kinase Pak1 suppresses yeast DNA polymerase mutations. *Molecular & General Genetics*, 256(1): 45-53, 1997.
71. HUANG, M.-E. & KOLODNER, R. D. A biological network in *Saccharomyces cerevisiae* prevents the deleterious effects of endogenous oxidative DNA damage. *Molecular Cell*, 17(5): 709-720, 2005.
72. IVANOV, E.L.; KOROLEV, V.G.; FABRE, F. *XRS2*, a DNA repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is needed for meiotic recombination. *Genetics*, 132: 651–664, 1992.
73. JACHYMCZYK, W.; VON BORSTEL, R.; MOWAT, M.; HASTINGS, P. Repair of interstrand cross-links in DNA of *Saccharomyces cerevisiae* requires two systems for DNA repair: the *RAD3* system and the *RAD51* system. *Molecular and General Genetics*, 182(2): 196–205, 1981.

74. JEPPESEN, D. K.; BOHR, V. A.; STEVNSNER, T. DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Progress in Neurobiology*, 94(2): 166-200, 2011.
75. KARATHIA, H.; VILAPRINYO, E.; SORRIBAS, A.; ALVES, R. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PloS One*, 6(2): e16015, 2011.
76. KARTALOU, M.; SAMSON, L.D.; ESSIGMANN, J. M. Cisplatin adducts inhibit 1,N(6)-ethenoadenine repair by interacting with the human 3-methyladenine DNA glycosylase. *Biochemistry*, 39(27): 8032-8038, 2000.
77. 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: 1561–1570, 2005.
78. KURTZ, J.E.; DUFOUR, P.; DUCLOS, B.; BERGERAT, J.P.; EXINGER, F. *Saccharomyces cerevisiae*: an efficient tool and model system for anticancer research. *Bulletin du Cancer*. 91: 133–139, 2004.
79. 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): 655–662, 2008.
80. LAMBERT, S.; MASON, S. J.; BARBER, L. J.; HARTLEY, J. A.; PEARCE, J. A.; CARR, A. M.; MCHUGH, P. J. *Schizosaccharomyces pombe* checkpoint response to DNA interstrand cross-links. *Molecular and Cellular Biology*, 23: 4728–4737, 2003.
81. LAWRENCE, C. The RAD6 DNA repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: what does it do, and how does it do it? *Bioessays*, 16: 253-258, 1994.
82. LEGERSKI, R.J. Repair of DNA interstrand cross-links during S phase of the mammalian cell cycle. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51: 540–551, 2010.
83. LEHOCZKÝ, P.; MCHUGH, P. J.; CHOVANEC, M. DNA interstrand cross-link repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(2): 109-133, 2007.
84. LEMONTT, J.F. Mutants of yeast defective in mutation induced by ultraviolet light. *Genetics*, 68: 21–33, 1971.
85. LENGSELD, B.M.; RATRAY, A. J.; BHASKARA, V.; GHIRLANDO, R.; PAULL, T. T. Sae2 is an endonuclease that processes hairpin DNA cooperatively with the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Molecular Cell*, 28(4): 638–51, 2007.
86. LI, G. M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, 18: 85-98, 2008.
87. LIMSON, M. V & SWEDER, K. S. Rapamycin inhibits yeast nucleotide excision repair independently of Tor kinases. *Toxicological Sciences*, 113(1): 77-84, 2010.
88. LISBY, M. & ROTHSTEIN, R. DNA repair: keeping it together. *Current Biology*, 14(23): R994–R996, 2004.

89. LISBY, M. & ROTHSTEIN, R. Choreography of recombination proteins during the DNA damage response. *DNA Repair*, 8: 1068-1076, 2009.
90. LIU, Y.; XU, X.; CARLSON, M. Interaction of SNF1 protein kinase with its activating kinase Sak1. *Eukaryotic Cell*, 10(3): 313-319, 2011.
91. LOBACHEV, K.S.; GORDENIN, D.A.; RESNICK, M.A. The Mre11 complex is required for repair of hairpin-capped double-strand breaks and prevention of chromosome rearrangements. *Cell*, 108: 183–193, 2002.
92. LOHMAN, P.H. Qualitative and quantitative procedures for health risk assessment. *Mutation Research*, 428: 237–254, 1999.
93. MA, Y.; PANNICKE, U.; SCHWARZ, K.; LIEBER, M. R. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*, 108(6): 781–794, 2002.
94. MACÉ-AIMÉ, G., COUVÉ, S.; KHASSENOV, B.; ROSSELLI, F.; SAPARBAEV, M. K. The Fanconi anemia pathway promotes DNA glycosylase-dependent excision of interstrand DNA crosslinks. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51(6): 508–519, 2010.
95. MAGAÑA-SCHWENCKE, N. & AVERBECK, D. Repair of exogenous (plasmid) DNA damaged by photoaddition of 8-methoxypsoralen in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, 251: 123–131, 1991.
96. MAGAÑA-SCHWENCKE, N.; HENRIQUES, J. A. P.; CHANET, R.; MOUSTACCHI, E. The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced crosslinks in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair-deficient strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(6): 1722-1726, 1982.
97. MAGER, W.H. & WINDERICKX, J. Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(5): 265–273, 2005.
98. MASUTANI, C.; KUSUMOTO, R.; YAMADA, A.; DOHMAE, N.; YOKOI, M.; YUASA, M.; ARAKI, M.; IWAI, S.; TAKIO, K.; HANAOKA, F. The XPV (Xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . *Nature*, 399: 700–704, 1999.
99. MATUO, R.; SOUSA, F. G.; SOARES, D. G.; BONATTO, D.; SAFFI, J.; ESCARGUEIL, A. E.; LARSEN, A. K.; HENRIQUES, J. A. P. *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study the response to anticancer agents. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 70(4): 491–502, 2012.
100. 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.

101. MCHUGH, P. J.; SONES, W. R.; HARTLEY, J. A. Repair of intermediate structures produced at DNA interstrand cross-links in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 20(10): 3425–3433, 2000.
102. MCHUGH, P.J.; SPANSWICK, V.J.; HARTLEY, J. A. Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *The Lancet Oncology*, 2(8): 483–90, 2001.
103. MCHUGH, P. J.; WARD, T. A; CHOVANEC, M. A prototypical Fanconi anemia pathway in lower eukaryotes? *Cell Cycle*, 11(20): 3739-3744, 2012.
104. MCVEY, M. Insights From Worms, Flies, Frogs, and Slime Molds. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51: 646–658, 2010.
105. MCVEY, M.; & LEE, S. E. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends in genetics*, 24(11): 529-538, 2008.
106. MILNE, G.T.; JIN, S.; SHANNON, K. B.; WEAVER, D. T. Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 16(8): 4189–4198, 1996.
107. MIMITOU, E. P. & SYMINGTON, L. S. Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature*, 455: 770–774, 2008.
108. MIMITOU, E. P. & SYMINGTON, L. S. Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. *The EMBO Journal*, 29(19): 3358-3369, 2010.
109. MISTELI, T. & SOUTOGLU, E. The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10: 243-254, 2009.
110. MOKDAD-GARGOURI, R.; BELHADJ, K.; GARGOURI, A. Translational control of human p53 expression in yeast mediated by 5'-UTR-ORF structural interaction. *Nucleic Acids Research*, 29(5): 1222–1227, 2001.
111. MORAES, M.C.S.; NETO, J.B.C.; MENCK, C.F.M. DNA repair mechanisms protect our genome from carcinogenesis. *Frontiers in Biosciences*, 17: 1362–1388, 2012.
112. MORISON, W.L. Psoralen ultraviolet A therapy in 2004. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 20: 315–320, 2004.
113. 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 adduct damage response. *Cell Cycle*, 9(11): 2220–2229, 2010.
114. MUNIANDY, P.; LIU, J.; MAJUMDAR, A.; LIU, S. T.; SEIDMAN, M. M. DNA interstrand cross-link repair in mammalian cells. Step by step. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 45(1): 23–49, 2010.

115. NATILE, G. & COLUCCIA, M. Current status of trans-platinum compounds in cancer therapy. *Coordination Chemistry Reviews*, 217: 383–410, 2001.
116. NIEDERNHOFER, L.J.; DANIELS, J. S.; ROUZER, C. A.; GREENE, R. E.; MARNETT, L. J. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 31426–31433, 2003.
117. NIEDERNHOFER, L. J.; ODIJK, H.; BUDZOWSKA, M.; VAN DRUNEN, E.; MASS, 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 and Cellular Biology*, 24: 5776–5787, 2004.
118. NOLL, D. M.; MASON, T. M.; MILLER, P. S. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chemical Reviews*, 106(2): 277-301, 2006.
119. NUSSENZWEIG, A. & NUSSENZWEIG, M. C. A backup DNA repair pathway moves to the forefront. *Cell*, 131: 2006-2008, 2007.
120. PALOMERA-SANCHEZ, Z. & ZURITA, M. Open, repair and close again: Chromatin dynamics and the response to UV-induced DNA damage. *DNA Repair*, 10:119-125, 2011.
121. PAN, X.; YE, P.; YUAN, D. S.; WANG, X.; BADER, J. S.; BOEKE, J. D. A DNA integrity network in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 124(5): 1069-1081, 2006.
122. PANASCI, L.; PAIEMENT, J. P.; CHRISTODOULOPOULOS, G.; BELENKOV, A.; MALAPETSA, A.; ALOYZ, R. Chlorambucil drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: the emerging role of DNA repair. *Clinical Cancer Research*, 7: 454–461, 2001.
123. PAULL, T. T.; GELLERT, M. The 3' to 5' exonuclease activity of Mre11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Molecular Cell*, 1:969–979, 1998.
124. PEREGO, P.; JIMENEZ, G. S.; GATTI, L.; HOWELL, S. B.; ZUNINO, F. Yeast mutants as a model systems for identification of determinants of chemosensitivity. *Pharmacology Reviews*, 52: 477–491, 2000.
125. PEREIRA, C.; COUTINHO, I.; SOARES, J.; BESSA, C.; LEÃO, M.; SARAIVA, L. New insights into cancer-related proteins provided by the yeast model. *The FEBS Journal*, 279(5): 697–712, 2012.
126. PRAKASH, L. & PRAKASH, S. Isolation and characterization of MMS-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 86: 33–55, 1977.
127. PRAKASH, S. & PRAKASH, L. Nucleotide excision repair in yeast. *Mutation Research*, 451(1-2): 13–24, 2000.
128. RABIK, C.A. & DOLAN, M.E., Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews*, 33(1): 9–23, 2007.

129. RESNICK, M.A. & COX, B.S. Yeast as an honorary mammal. *Mutation Research*, 451(1-2): 1–11, 2000.
130. RODARTE-RAMÓN, U. S. & MORTIMER, R. K. Radiation-induced recombination in *Saccharomyces*: isolation and genetic study of recombination-deficient mutants. *Radiation Research*, 49: 133–147, 1972.
131. RUHLAND, A.; HAASE, E.; SIEDE, W.; BRENDEL, M. Isolation of yeast mutants sensitive to the bifunctional alkylating agent nitrogen mustard. *Molecular and General Genetics*, 181: 346–351, 1981.
132. RUPNIK, A.; LOWNDES, N. F.; GRENON, M. MRN and the race to the break. *Chromosoma*, 119(2): 115-135, 2010.
133. SARASIN, A. & STARY, A. New insights for understanding the transcription-coupled repair pathway. *DNA Repair*, 6: 265-269, 2007.
134. SCHÄRER, O.D. DNA interstrand crosslinks: natural and drug-induced DNA adducts that induce unique cellular responses. *ChemBioChem*, 6(1): 27–32, 2005.
135. SHEN, X. & LI, L. Mutagenic repair of DNA interstrand crosslinks. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51: 493–499, 2010.
136. SHIM, E. Y.; CHUNG, W.-H.; NICOLETTE, M. L.; ZHANG, Y.; DAVIS, M., ZHU, Z.; PAULL, T. T.; IRA, G.; Lee, S. E. *Saccharomyces cerevisiae* Mre11/Rad50/Xrs2 and Ku proteins regulate association of Exo1 and Dna2 with DNA breaks. *The EMBO journal*, 29(19): 3370–3380, 2010.
137. SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22: 7265–7279, 2003.
138. SIEDE, W. & BRENDEL, M. Isolation and characterization of yeast mutants with thermoconditional sensitivity to the bifunctional alkylating agent nitrogen mustard. *Current Genetics*, 4: 145-149, 1981.
139. SIEDE, W. & BRENDEL, M. Interactions among genes controlling sensitivity to radiation (*RAD*) and to alkylation by nitrogen mustard (*SNM*) in yeast. *Current Genetics*, 5: 33–38, 1982.
140. STEWART, G. S.; MASER, R. S.; STANKOVIC, T.; BRESSAN, D. A.; KAPLAN, M. I.; JASPERS, N. G.; RAAMS, A.; BYRD, P. J.; PETRINI, J. H.; TAYLOR, A. M. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell*, 99: 577–587, 1999.
141. STRACKER, T. H. & PETRINI, J. H. J. The MRE11 complex: starting from the ends. *Nature*, 12(2): 90–103, 2011.
142. SWANSON, R. L.; MOREY, N. J.; DOETSCH, P. W.; JINKS-ROBERTSON, S. Overlapping specificities of base excision repair, nucleotide excision repair,

recombination, and translesion synthesis pathways for DNA base damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 19(4): 2929–2935, 1999.

142. 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.

144. SYMINGTON, L. S. & GAUTIER, J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual review of genetics*, 45: 247–271, 2011.

145. TIEFENBACH, T. Functional analysis of Pso2 reveals a novel DNA hairpin endonuclease activity: Implications for interstrand crosslink repair. PhD Thesis, Biochemistry and Biomedical Sciences, McMaster University, Canada, 2011.

146. TIEFENBACH, T. & JUNOP, M. Pso2 (SNM1) is a DNA structure-specific endonuclease. *Nucleic Acids Research*, 40(5): 2131-2139, 2012.

147. TRUJILLO, K. M. & SUNG, P. DNA structure-specific nuclease activities in the *Saccharomyces cerevisiae* Rad50/Mre11 complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 35458–35464, 2001.

148. TSUKAMOTO, Y.; MITSUOKA, C.; 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.

149. UNGAR, L.; HARARI, Y.; TOREN, A.; KUPIEC, M. Tor complex 1 controls telomere length by affecting the level of Ku. *Current Biology*, 21(24): 2115-2120, 2011.

150. USUI, T.; OHTA, T.; OSHIUMI, H.; TOMIZAWA, J.; OGAWA, H.; OGAWA, T. Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination. *Cell*, 95: 705–716, 1998.

151. VAN ATTIKUM, H. & GASSER, S. M. ATP-dependent chromatin remodeling and DNA double-strand break repair. *Cell cycle*, 4(8): 1011-1014, 2005.

152. VARON, R.; VISSINGA, C.; PLATZER, M.; CEROSALETTI, K. M.; CHRZANOWSKA, K. H.; SAAR, K.; BECKMANN, G.; SEEMANOVA, E.; COOPER, P. R.; NOWAK, N. J.; STUMM, M.; WEEMAES, C.M.; GATTI, R. A.; WILSON, R. K.; DIGWEED, M.; ROSENTHAL, A.; SPERLING, K.; CONCANNON, P.; REIS, A. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell*, 93: 467–476, 1998,

153. VASQUEZ, K. M. Targeting and processing of site-specific dna interstrand crosslinks. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51: 527-539, 2010.

154. VASQUEZ, K. M.; & LEGERSKI, R. J. DNA interstrand crosslinks: repair, cell signaling, and therapeutic implications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51: 491-492, 2010.

155. WARD, T. A.; DUDÁŠOVÁ, Z.; SARKAR, S.; BHIDE, M. R.; VLASÁKOVÁ, D.; CHOVANEC, M.; MCHUGH, P. J. Components of a Fanconi-like pathway control Pso2-independent DNA interstrand crosslink repair in yeast. *PLoS Genetics*, 8(8): e1002884, 2012.
156. WIJEN, J.P.; NIVARD, M.J.; VOGEL, E.W. The in vivo genetic activity profile of the monofunctional nitrogen mustard 2-chloroethylamine differs drastically from its bifunctional counterpart mechlorethamine. *Carcinogenesis*, 21(10): 1859–1867, 2000.
157. WILBORN, F. & BRENDDEL, M. Formation and stability of interstrand cross-links induced by cis-diamminedichloroplatinum and trans-diamminedichloroplatinum (II) in the DNA of *Saccharomyces cerevisiae* strains differing in repair capacity. *Current Genetics*, 16: 331–338, 1989.
158. WOOD, R. D. Mammalian nucleotide excision repair proteins and interstrand crosslink repair. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51: 520-526, 2010.
159. WU, W.; SUHASINI, A. N.; BROSH JR, R. M. Repair of radiation induced DNA double strand breaks by backup NHEJ is enhanced in G2. *DNA Repair*, 7: 329-338, 2008.

Curriculum Vitae

Curriculum vitae resumido

MUNARI, F.M.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Fernanda Mosena Munari

Local e data de nascimento: Caxias do Sul, RS, Brasil, 27/08/1974

Endereço profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Departamento de Biofísica

Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43422, Lab. 210

Bairro Agronomia

CEP 90050-150 - Porto Alegre, RS

Telefone profissional: (51) 3308-7602

E-mail: fmmunari@gmail.com

2. FORMAÇÃO

Mestrado

2001 - 2003 – Mestrado em Biotecnologia pela Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brasil

Graduação

1994 - 1999 – Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brasil

3. ESTÁGIOS

03/1995 - 08/1997 - Estágio de Iniciação Científica

Universidade de Caxias do Sul - UCS

Vínculo: Instituto de Biotecnologia - Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Bolsista de Iniciação científica CNPq/RHAE.

Orientador: Sérgio Echeverrigaray Laguna

Projeto desenvolvido: Micropropagação de uva-do-japão (*Hovenia dulcis*) através de meristemas, visando seu potencial uso na indústria madeireira.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

2008 - Accuracy comparison of a new PCR assay to culture-based methods for the screening of Group B Streptococcus (GBS) in pregnant women. **Menção Honrosa.** 1º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, Gramado, RS, 2008.

2007 - Atividade sinérgica de violaceína e oxacilina contra isolados de *Staphylococcus* sp. metilina-resistentes (MRS) e *Staphylococcus aureus* metilina-resistentes (MRSA). **Melhor Pôster.** 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, 2007.

5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA

10/2010 - 01/2011 - Atividade de Docência

5ª Edição do Curso de Férias – Verão 2011

Tema: "Plantas... Como funcionam?"

Carga horária: 60 horas

Responsável: Célia R. Carlini

08/2005 - 12/2006 - Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Vínculo: Pesquisadora visitante, Centro de Pesquisas - Laboratório de Biologia Molecular em Doenças Auto-imunes e Infecciosas, Bolsista CNPq/ DTI.

Orientação: Jomar Laurino e Ricardo Machado Xavier

Atuação nos projetos de pesquisa:

Atividade de violaceína em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* produtores e não produtores de biofilmes.

Caracterização de proteínas recombinantes de *Mycoplasma synoviae* e *M. hyopneumoniae* com potencial para utilização em imunodiagnóstico e vacinação.

Prevalência de *Streptococcus* do Grupo B (*Sptreptococcus agalactiae*) em gestantes.

Padronização da técnica de PCR multiplex para avaliar periodontopatógenos em pacientes que serão submetidos ao transplante de medula óssea.

06/2004 - 06/2005 - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Vínculo: Centro de Biologia Genômica e Molecular, Bolsista CNPq DTI.

Orientação: Jomar Laurino

Atuação nos projetos de pesquisa:

Identificação de espécies de *Clostridium* de importância veterinária através da técnica de seqüenciamento de DNA. Atividade de violaceína em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* produtores e não produtores de biofilmes.

Identificação de *Sptreptococcus agalactiae* em gestantes utilizando a técnica de PCR.

08/2002 - 12/2002 – Universidade de Caxias do Sul - UCS - Estágio de docência

Disciplina: Citologia, para o curso de Graduação em Ciências Biológicas.

Professor responsável: Aldo José Pinheiro Dillon

Atividades desenvolvidas: Planejamento de aulas teóricas e práticas, com reuniões semanais para o planejamento de roteiro e execução das aulas práticas; planejamento e execução de aula sobre mitocôndrias e fermentações; planejamento e execução das aulas de revisão; auxílio na execução das aulas práticas; auxílio no planejamento e execução das avaliações; auxílio no controle da frequência dos alunos e correção das avaliações; fechamento das notas.

6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

1. **Munari, F. M.**, de-Paris, F., Salton, G. D., Lora, P. S., Giovanella, P., Machado, A. B. M. P., Laybauer, L. S., Oliveira, K. R. P., Ferri, C., Silveira, J. L. S., Laurino, C. C. F. C., Xavier, R. M., Barth, A. L., Echeverrigaray, S., Laurino, J. P. A combined enrichment/polymerase chain reaction based method for the routine screening of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 43, p253-260, 2012.

2. Simionatto, S., Marchioro, S. B., Galli, V., Hartwig, D. D., Carlessi, R. M., **Munari, F. M.**, Laurino, J. P., Conceição, F. R., Dellagostin, O. A. Cloning and purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, v. 69, p132 -136, 2010.

3. **Munari, F. M.**, Gaio, T. A., Calloni, R., Dillon, A. J. P. Decolorization of textile dyes by enzymatic extract and submerged cultures of *Pleurotus sajor-caju*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.24, p1383-1392, 2008.

4. **Munari, F. M.**, Gaio, T. A., Dillon, A. J. P. Phenol degradation and color removal in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju* with paper mill effluents. *Biocatalysis and Biotransformation*, v.25, p24-28, 2007.

5. Echeverrigaray, S., Mossi, A. J., **Munari, F. M.** Micropropagation of raisin tree (*Hovenia dulcis*) through axillary bud culture. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, v.7, p99-102, 1998.

7. PROCESSOS OU TÉCNICAS COM REGISTRO OU PATENTE

1. Laurino, J. P., **Munari, F. M.**, Salton, G. D. Processo e Kit para a Identificação de Estreptococo do grupo B por PCR. 2008. Patente: Privilégio de Inovação n. PI 0805203-4 (Depósito).

8. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

8.1 Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Ribeiro, A. V., Aguiar C. C., Chiodi, C. G., Nör, C., Costa, C. T., Tichota, D. M.,

Oliveira E. S., Villodre, E. S., Lopes, F. C., **Munari, F. M.**, Sachett, L. G., Tirloni, L., Almeida, M., Andrade J. A. P., Abreu, J. B., Perini, P., Jorge, P. M., Cecagno, R., Braun R. L., Pizzato, S. B., Ferreira Junior, S. L. M., Coelho, T. S., Becker-Ritt, A. B., Carlini, C. R. Curso de Férias: Uma alternativa didática ou uma didática alternativa? In: XIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011, Porto Alegre. Livro de Resumos, p. 17.

2. **Munari, F. M.**, Revers, L. F., Cardone, J. M., Bonatto, D., Henriques, J. A. P. Pak1p, a Putative Partner of Pso2p/Snm1p in Repair of DNA Interstrand Cross-Links in *Saccharomyces cerevisiae*. In: XIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011, Porto Alegre. Livro de Resumos, p. 51.

3. **Munari, F. M.**, Moura, D. J., Cardone, J. M., Revers, L. F., Bonatto, D., Henriques, J. A. P. Estudo da função da proteína Pso2 na reparação de pontes intercadeias no DNA induzidas por 8-metoxipsoraleno e UVA em *Saccharomyces cerevisiae*. In: XII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2010, Porto Alegre. Livro de Resumos, p. 31.

4. Bustamante-Filho, I. C., Salton, G. D., **Munari, F. M.**, Schneider, M. R., Mattos, R. C., Laurino, J. P., Jobim, M. I. M., Cirne-Lima, E. O. Produção recombinante de forma ativa de proteína do plasma seminal bovino relacionada à congelabilidade do sêmen. In: 30ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2010, Porto Alegre. Revista do HCPA, 2010, v. 30, p.14-15.

5. Bustamante-Filho, I. C., Salton, G. D., **Munari, F. M.**, Schneider, M. R., Mattos, R. C., Laurino, J. P., Chies, J. A. B., Cirne-Lima, E., Jobim, M. I. M. Recombinant production of a bioactive form of the bovine acidic Seminal Plasm Fluid Protein (aSFP). In: III International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 2010, Águas de São Pedro-SP. Animal Reproduction, 2010, v. 7, p. 279.

6. **Munari, F. M.**, Cardone, J. M., Revers, L. F., Henriques, J. A. P. Pak1p – Uma possível parceira da Pso2p/Snm1p no reparo de pontes intercadeia no DNA em *Saccharomyces cerevisiae*. XI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2009, Porto Alegre. Livro de Resumos.

7. Bustamante-Filho, I. C., Salton, G. D., **Munari, F. M.**, Schneider, M. R., Mattos, R. C., Laurino, J. P., Jobim, M. I. M., Cirne-Lima, E. O. Clonagem e expressão da proteína ácida do fluido seminal bovina recombinante (RASFP-6XHIS) em *Escherichia coli*. In: 29ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2009, Porto Alegre. Revista do HCPA, 2009, v. 29, p.21-22.

8. Bustamante-Filho, I. C., Salton, G. D., **Munari, F. M.**, Cirne-Lima, E. O., Schneider,

M. R., Gregory, R. M., Laurino, J. P., Mattos, R. C., Jobim, M. I. M. Clonagem e expressão da proteína ácida do fluido seminal bovina recombinante (raSFP) em *Escherichia coli*. In: XVIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2009, Belo Horizonte - MG. Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), 2009, p. 365.

9. **Munari, F. M.**, Cardone, J. M., Bonatto, D., Henriques, J. A. P. A função da proteína Pso2/Snm1 no mecanismo de manutenção da integridade genômica de *Saccharomyces cerevisiae*. IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2007, Porto Alegre. Livro de Resumos, p. 63.

10. **Munari, F. M.**, Xavier, R. M., Echeverrigaray, S., Delamare, A. P. L., Laurino, C. C. F. C., Laurino, J. P. Atividade antimicrobiana de violaceína contra isolados clínicos de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e isolados de *Candida*. In: 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2007, Porto Alegre. Revista do HCPA, 2007, v. 27, p.109.

11. **Munari, F. M.**, Xavier, R. M., Barth, A. L., Lutz, L., Pinheiro, A. B. M., Laurino, C. C. F. C., Laurino, J. P. Atividade sinérgica de violaceína e oxacilina contra isolados de *Staphylococcus* sp. meticilina-resistentes (MRS) e *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes (MRSA). In: 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2007, Porto Alegre. Revista do HCPA, 2007, v. 27, p.109.

12. Bustamante-Filho, I. C., Salton, G. D., **Munari, F. M.**, Laurino, J. P., Jobim, M. I. M., Cirne-Lima, E. O. Clonagem e expressão de proteínas recombinantes do plasma seminal bovino relacionadas com a alta congelabilidade e fertilidade do sêmen. In: 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2007, Porto Alegre. Revista do HCPA, 2007, v 27, p. 238.

13. **Munari, F. M.**, Xavier, R. M., Laurino, C. C. F. C., Laurino, J. P. Atividade de violaceína em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* produtores e não produtores de biofilmes. In: 26ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2006, Porto Alegre. Revista do HCPA, 2006, v 26, p. 244.

14. Salton, G. D., Carlessi R. M., Laurino, C. C. F. C., **Munari, F. M.**, Xavier, R. M., Henriques, J. A. P., Laurino, J. P. Expressão e purificação de eIF2 beta humano para a produção de soro policlonal anti-eIF2 beta. In: 26ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2006, Porto Alegre. Revista do HCPA, 2006, v 26, p. 243.

15. Carlessi, R. M., **Munari, F. M.**, Salton, G. D., Laurino, C. C. F. C., Cardone, J. M., Saffi, J., Xavier, R. M., Laurino, J. P., Henriques, J. A. P. Expressão e purificação de Pso2/Smn1 de *Saccharomyces cerevisiae* em *Escherichia coli* e produção de anticorpos policlonais anti-Pso2/Smn1. In: 26ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto

Alegre, 2006, Porto Alegre. Revista do HCPA, 2006, v 26, p.241.

16. Salton, G. D., **Munari, F. M.**, Laurino, C. C. F. C., Carlessi, R. M., Henriques, J. A. P., Xavier, R. M., Laurino, J. P. Expressão heteróloga e caracterização de uma ATPase de *Pseudomonas aeruginosa*. In: 26ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2006, Porto Alegre. Revista do HCPA, 2006, v 26, p.245.

17. Carlessi, R. M., **Munari, F. M.**, Salton, G. D., Laurino, C. C. F. C., Xavier, R. M., Laurino, J. P. Expressão heteróloga e purificação da proteína p36 de *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: 26ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2006, Porto Alegre. Revista do HCPA, 2006, v 26, p.241.

18. Carlessi, R. M., Laurino, J. P., **Munari, F. M.**, Cardone, J. M., Saffi, J., Henriques, J. A. P. Expressão heteróloga e purificação de Pso2/Smn1 de *Saccharomyces cerevisiae* e produção de soro policlonal hiperimune anti-Pso2/Smn1. In: 52º Congresso Brasileiro de Genética, 2006, Foz do Iguaçu. Anais do 52º Congresso Brasileiro de Genética.

19. Silveira, J. L. S., **Munari, F. M.**, Giovanella, P., Ferri, C., Fiori, R. M., Xavier, R. M., Laurino, J. P. Prevalência de *Streptococcus agalactiae* em gestantes de Uruguaiana-RS detectada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). In: 26ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2006, Porto Alegre. Revista do HCPA, 2006, v 26, p.65.

20. Carlessi, R. M., Salton, G. D., **Munari, F. M.** Expressão, solubilização e purificação da proteína P36 de *Mycoplasma hyopneumoniae*, fusionada com GST. In: XVII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2005, Porto Alegre. Livro de resumos do XVII Salão de Iniciação Científica.

21. **Munari, F. M.**, Gaio, T. A., Calloni, R., Dillon, A. J. P. Descoloração de corantes têxteis com o uso de caldo enzimático de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em estado sólido. In: VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática (ENZITEC), 2004, Rio de Janeiro. Livro de resumos do ENZITEC, p.220.

22. **Munari, F. M.**, Barba-Castillo, S., Riveros, R., Andrade, M. Z., Calloni, R., Dillon, A. J. P. Produção e imobilização de lacases de *Pleurotus sajor-caju*. In: VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2004, Rio de Janeiro. Livro de resumos do ENZITEC, p. 40.

23. Poletto, N. P., Cassini, C., **Munari, F. M.**, Dillon, A. J. P., Salvador, M. Antioxidant capacity and nutritional analysis of *Pleurotus sajor-caju* produced in southern Brazil. In: VIII Taller International sobre Calidad Sanitaria, Evaluación y Conservación de Alimentos, 2003, Varadero, Cuba. Libro de programa y resúmenes, p.211.

24. **Munari, F. M.**, Gaio, T. A., Dillon, A. J. P. Cinética de Secreção de lacases e peroxidases e degradação de fenóis totais em cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju* com efluentes da indústria papeleira. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações (SINAFERM), 2003, Florianópolis. Trabalho completo no CD ROM Sinaferm 2003.
25. **Munari, F. M.**, Dillon, A. J. P., Gaio, T. A. Atividade de lacases como indicativo da intensidade de podridão-cinzenta de uvas causada por *Botrytis cinerea*. In: 5º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2002, Brasília. Livro de resumos do 5º ENZITEC.
26. **Munari, F. M.**, Echeverrigaray, S. Micropropagação de uva-do-japão (*Hovenia dulcis*) através da cultura de meristemas. In: IV Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 1996, Caxias do Sul. Livro de resumos.
27. **Munari, F. M.**, Mossi, A. J., Echeverrigaray, S. Micropropagação de uva-do-japão (*Hovenia dulcis* T.). In: III Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 1995, Caxias do Sul. Livro de resumos.

8.2 Apresentação Oral de Trabalhos em Congressos

1. **Munari, F. M.**, Gaio, T. A., Calloni, R., Dillon, A. J. P. Descoloração de corantes têxteis com o uso de caldo enzimático de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em estado sólido. In: VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática (ENZITEC), 2004, Rio de Janeiro. Apresentação oral.
2. **Munari, F. M.**, Gaio, T. A., Dillon, A. J. P. Cinética de secreção de lacases e peroxidases e degradação de fenóis totais em cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju* com efluentes da indústria papeleira. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações (SINAFERM), 2003, Florianópolis. Apresentação oral.