UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

Thais Raupp Azevedo

Papel da proteína Pso2 na resposta a danos no DNA do tipo ICL em *Saccharomyces cerevisiae*

Porto Alegre
2021

Thais Raupp Azevedo

Papel da proteína Pso2 na resposta a danos no DNA do tipo ICL em *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador(a): Dra. Dinara Jaqueline Moura
Coorientador(a): Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Porto Alegre
2021

INSTITUIÇÃO E FONTE FINANCIADORA

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, com suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Chamada FAPERGS/MS/CNPq/SESRS n. 03/2017 – PPSUS (processo número 17/2551-0001 388-3).

AGRADECIMENTOS

À professora Dinara Jaqueline Moura, minha orientadora, pelo acolhimento, confiança, ensinamentos e por permitir que ao seu lado minha realização pessoal fosse concretizada! Muito obrigada pela oportunidade!

Ao meu coorientador professor João Antonio Pêgas Henriques por todos os ensinamentos e por ter sido uma grande inspiração para cada passo dado e construído neste trabalho. Muito obrigada!

À todos os colegas do Laboratório de Genética Toxicológica, em especial à Bruna, Ana, Verônica, Pablo, Dani, Fran e Paula, que de alguma forma me ajudaram na realização deste projeto e no meu desenvolvimento como pesquisadora.

À Luiza, aluna de Iniciação Científica, que esteve comigo por um breve período, mas o suficiente para me proporcionar uma experiência de “orientadora”/troca de conhecimento incrível!

Aos meus pais, Valdir e Vera, por sempre acreditarem em mim! Saibam que escutar “não desista minha filha” fez toda diferença! Amo vocês!

Ao meu marido Willian pela paciência, incentivo, parceria, amor e por sempre estar ao meu lado quando precisei. Sem a força que me transmitiu não teria conseguido! Amo-te!

Ao meu filho Pedro que nos momentos mais difíceis foi quem me inspirou para seguir em frente! É a minha motivação diária! Amo-te!

Aos amigos queridos, agradeço pelos “ombros amigos” que tantas vezes foram necessários!

"As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos"

Paulo Baleki

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO
1.1 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo 10
1.1.1 Estudo do reparo de DNA utilizando a levedura *S. cerevisiae* 10
1.2 Lesões na molécula de DNA 15
1.2.1 Pontes intercadeia (ICL) 17
1.3 Respostas a ICL em *S. cerevisiae* 19
1.3.1 Reparo por excisão de nucleotídeo 20
1.3.2 Recombinação Homóloga 21
1.4 Proteína Pso2 22
1.4.1 Estrutura 3D da proteína Pso2 23
1.5 Complexo MRX 24
1.6 Proteína Kin3 25
2. OBJETIVOS 27
2.1 Objetivo geral 27
2.2 Objetivos específicos 27
3. ARTIGO CIENTÍFICO 28
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS 53
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54
6. CURRÍCULO LATTES 64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BER - Reparo de excisão de base

CIS - Cisplatina

CPD - Dímero de pirimidina

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DSB - Quebra dupla no DNA

ERO - Espécie reativa de oxigênio

EXO1 - Exonuclease 1

GGR-NER - Reparo global do genoma

HR - Recombinação homóloga

IaCL - Ponte intracadeia

ICL - Ponte intercadeia (*interstrand crosslink*)

RI - Radiação ionizante

MBL - Meto-b-lactamase

MMS - Metilmetanosulfonato

NER - Reparo por excisão de nucleotídeo

NIMA - *never in mitosis A*

NRK - *NIMA-related kinases*

PDB - Protein Data Bank

RPA - Proteína de replicação A

SSB - Quebra de fita simples

STL - Síntese translesão

TCR-NER - Reparo acoplado à transcrição

6-4 PP - 6-4 fotoproduto

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura I - Ciclo de vida da levedura *Saccharomyces cerevisiae* por fase haploide e diploide 11

Figura II - Curva de crescimento de uma linhagem selvagem de *Saccharomyces cerevisiae* em meio rico e em meio mínimo 12

Tabela I - Grupos de epistasia dos genes de *Saccharomyces cerevisiae* envolvidos em reparação de danos no DNA 14

Figura III - Tipos de danos no DNA gerados a partir de um agente indutor 17

Figura IV- Formação de aduto entre cisplatina e DNA 18

RESUMO

As pontes intercadeias (*interstrand crosslink*, ICL) entre compostos e DNA são lesões bastante citotóxicas que afetam os processos de replicação e transcrição da molécula de DNA.. A cisplatina (CIS), um antineoplásico, é um agente bifuncional que se liga covalentemente às bases do DNA podendo formar ICLs. A proteína Pso2 foi identificada inicialmente em *Saccharomyces. cerevisiae* e demonstrou estar envolvida na reparação de danos induzidos por agentes bifuncionais, executando função de exonuclease e endonuclease. O complexo MRX (Mre11, Rad50 e Xrs2) está envolvido na resposta a danos no DNA e uma das funções bioquímicas desse complexo é a capacidade de realizar incisões no esqueleto fosfodiéster do DNA com sua atividade endonucleásica. As cepas mutantes do gene *KIN3* são sensíveis a diferentes agentes indutores de dano ao DNA e as proteínas Kin3 e MRX interagem geneticamente de maneira epistática após o estresse mutagênico. Neste trabalho, propomos um modelo 3D da estrutura do Pso2, assim como verificamos a existência de interação genética desta proteína com o complexo MRX e Kin3, durante o tratamento com CIS. Curvas de sobrevivência para avaliar a sensibilidade de mutantes simples e duplos dessas proteínas foram realizadas em diferentes concentrações de cisplatina, por 2 horas e 24 horas. Os simples mutantes *pso2*Δ, *rad50*Δ e *mre11*Δ apresentaram um aumento de citotoxicidade concentração dependente nos dois tempos de tratamentos, enquanto os mutantes de *kin3*Δ e *xrs2*Δ apresentaram uma sensibilidade menos pronunciada. Por outro lado, os duplos mutantes *kin3*Δ*pso2*Δ, *rad50*Δ*pso2*Δ, *xrs2*Δ*pso2*Δ e *mre11*Δ*pso2*Δ apresentaram ausência de sensibilidade após 2 e 24 horas de tratamento com cispatina. Para entender a reversão da sensibilidade nos duplos mutantes, avaliamos a expressão das nucleases *MRE11*, *DNA2* e *EXO1* nas cepas *xrs2*Δ, *pso2*Δ e *xrs2*Δ*pso2*Δ. Os resultados da superexpressão de EXO1 e MRE11 em *pso2*Δ indicam um substrato comum entre esses genes.

ABSTRACT

Interstrand crosslink (ICL) between compounds and DNA are very cytotoxic lesions that affect the replication and transcription processes of the DNA molecule. Cisplatin (CIS), an antineoplastic agent, is a bifunctional agent that covalently binds to the bases of DNA and can form ICLs. The Pso2 protein was initially identified in *Saccharomyces cerevisiae* and has been shown to be involved in the repair of damage induced by bifunctional agents, performing exonuclease and endonuclease functions. The MRX complex (Mre11, Rad50 and Xrs2) is involved in the response to DNA damage and one of the biochemical functions of this complex is the ability to make incisions in the DNA phosphodiester skeleton since have endonuclease activity. The mutant strains of the *KIN3* gene are sensitive to different agents that damage DNA, beside the Kin3 and MRX proteins interact genetically in an epistatic manner after mutagenic stress. In this work, we propose a 3D model of the structure of Pso2, as well as we verify the existence of genetic interaction of this protein with the MRX and Kin3 complex, during treatment with CIS. Survival curves to assess the sensitivity of single and double mutants of these proteins were performed at different concentrations of cisplatin, for 2 hours and 24 hours. The simple mutants *pso2*Δ, *rad50*Δ and *mre11*Δ showed a similar reduction in survival in both treatments, while the kin3Δ and xrs2Δ mutants showed a less pronounced sensitivity. On the other hand, the double mutants *kin3*Δ*pso2*Δ, *rad50*Δ*pso2*Δ, *xrs2*Δ*pso2*Δ and *mre11*Δ*pso2*Δ showed high survival after 2 and 24 hours of treatment. To understand the reversal of sensitivity in the double mutants, we evaluated the expression of the *MRE11, DNA2* and *EXO1* nucleases in the *xrs2*Δ, *pso2*Δ and *xrs2*Δ*pso2*Δ strains. The results of overexpression of *EXO1* and *MRE11* in *pso2*Δ indicate a common substrate between these genes.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo

Saccharomyces é um gênero de levedura composto por oito espécies (BOYNTON; GREIG, 2014). A espécie *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo utilizada há séculos na produção de vinhos, na panificação e na indústria fermentativa em geral (LITI et al., 2009; GALLONE et al., 2016; PETER et al., 2018). Suas ferramentas genéticas são bem estabelecidas, sendo o genoma de *S. cerevisiae*, o primeiro de um eucarioto a ser sequenciado no ano de 1986 (GOFFEAU et al., 1996). A levedura *S. cerevisiae* apresenta diversas características que a tornam um ótimo modelo de estudo para processos moleculares. Trata-se de um organismo com baixo custo de cultivo, com capacidade rápida de multiplicação, estágio haplóide e diploide durante o ciclo de vida, fácil manipulação genética - por ter uma via de recombinação homóloga muito eficiente, que permite mutar o seu genoma ou mesmo inserir DNA exógeno com elevada eficiência - entre outras inúmeras vantagens (HENRIQUES et al., 1997; BARR, 2003; SUGIYAMA et al., 2009; BOTSTEIN; FINK, 2011).

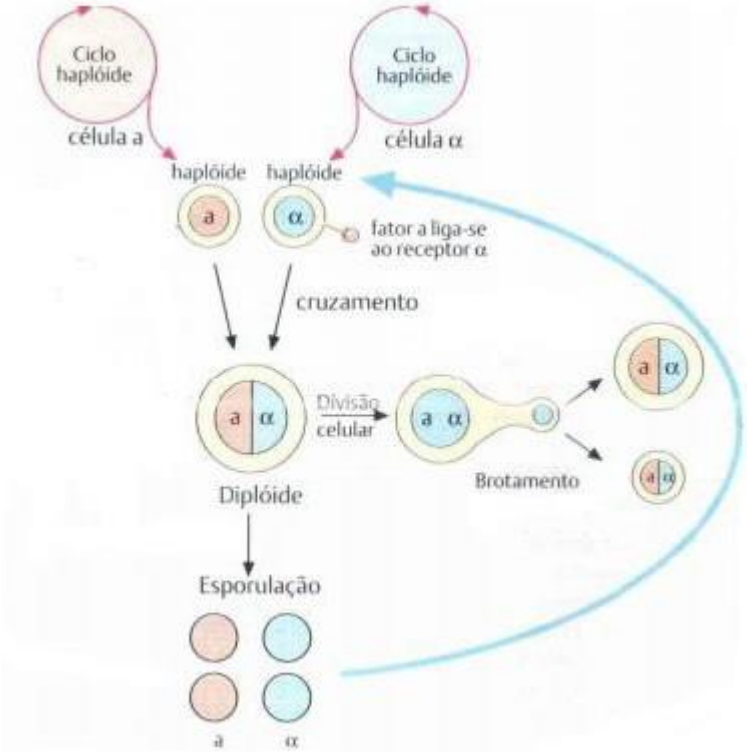
Avanços na área de reparação do DNA e das vias celulares e moleculares de doenças humanas, incluindo o câncer, foram possíveis devido à conservação de genes e sistemas durante a evolução, permitindo essa investigação diretamente em leveduras (KURTZ et al., 2004; ALMEIDA et al., 2008; KARATHIA et al., 2011; RESNICK; COX, 2000). Sendo assim, a função de proteínas e o funcionamento de seus mecanismos também podem ser estudados nestes organismos (BOTSTEIN; FINK, 2011; PEREIRA et al., 2012).

1.1.1 Estudo do reparo de DNA utilizando a levedura *S. cerevisiae*

Na levedura *S. cerevisiae* as células diploides se reproduzem através de brotamento ou esporulação (meiose/gerando células haploides) enquanto as células haploides de tipos de cruzamento diferentes (a e α) fundem-se formando uma célula diploide (Figura I). Este último processo acontece através do reconhecimento de um feromônio (polipeptídeo) por um receptor da superfície celular. Em torno de aproximadamente 90 minutos, quando em condições adequadas, as células de *S. cerevisiae* possuem a capacidade de dividir-se alcan-

çando um diâmetro médio de 3 a 5 µm (BOULTON; QUAIN, 2001; PRETORIUS, 2000; PASSARGE, 2004).

Figura I

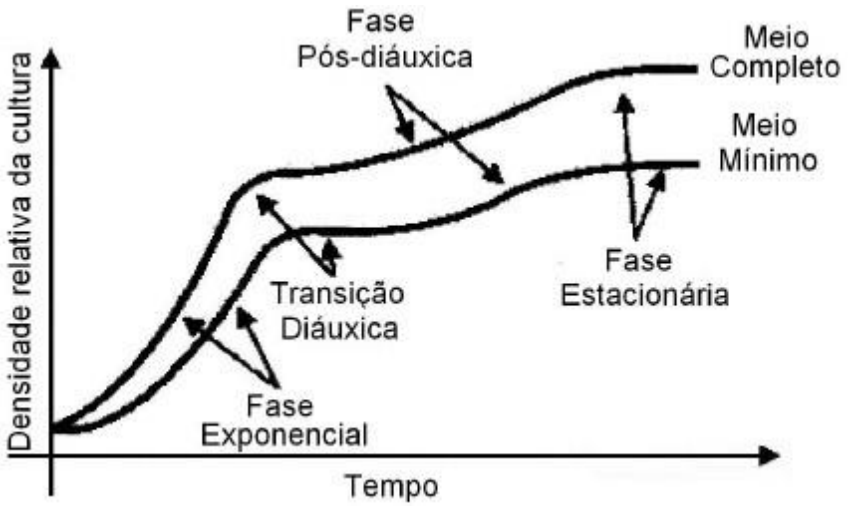


Ciclo de vida da levedura *Saccharomyces cerevisiae* **por fase haploide e diploide**. (Adaptado de PASSARGE, 2004).

A glicose é a sua preferencial fonte de carbono, sendo um organismo anaeróbico facultativo e apresentando duas fases durante o seu crescimento: lag e exponencial. Durante a fase lag a levedura adapta-se ao novo meio criando condições necessárias para a divisão celular (sintetizando enzimas e coenzimas) que começará na fase exponencial. Nesta fase, a energia oriunda da fermentação é a fonte para o crescimento exponencial das células. Com a diminuição da disponibilidade de glicose no meio, uma desrepressão catabólica (transição diáuxica) é ocasionada, levando a parada da divisão celular e uma preparação das células para o início do metabolismo respiratório. A levedura passa a utilizar como

fonte de carbono o etanol (fase pós-diáuxica) gerado durante a fermentação, reiniciando a divisão celular mais lentamente. Com o esgotamento de todas as fontes de carbono a levedura inicia a fase estacionária e ainda pode sobreviver por muito tempo (Figura II) (PRINGLE et al, 1997; DE WIND et al, 1997; FUGE; WERNER-WASHBURNE, 1997; GANCEDO, 1998).

Figura II



Curva de crescimento de uma linhagem selvagem de *Saccharomyces cerevisiae* **em meio rico e em meio mínimo.** (Adaptado de FUGE; WERNER-WASHBURNE, 1997).

Diversos genes envolvidos no reparo de lesões no DNA já foram identificados nos 16 cromossomos existentes em *S. cerevisiae*, apresentando um alto grau de homologia com genes de outros organismos, como por exemplo, dos mamíferos (FRIEDBERG, 1991; FRIEDBERG et al, 1995; BRENDEL; HENRIQUES, 2001; BRENDEL et al, 2003). Cerca de 70% do genoma de 13.389 kb codifica 6.000 proteínas, sendo 46% já identificadas e 1.400 apresentando homologia com proteínas conhecidas (WINZELER; DAVIS, 1997; WINZELER et al., 1999). *O Saccharomyces Genome Database* (SGD; http://www.yeastgenome.org/) disponibiliza o acesso e informações sobre os genes deste organismo.

Ensaios de mutagenicidade farmacológicos e ambientais realizados em leveduras servem para complementação aos realizados em bactérias (POLI et al., 1999; TEERZIYSKA et al., 2000). Esses ensaios apresentam identificações biológicas confiáveis, são rápidos, tendo ainda a vantagem sobre ensaios bacterianos devido a levedura possuir um complexo enzimático de detoxificação (citocromo P-450) que realiza ativação metabólica, dispensando a necessidade de adicionar um sistema exógeno (PAULA-RAMOS et al., 1991; MORENO et al., 1991; POLI et al., 1999).

A troca de material genético entre dois cromossomos homólogos é um dos mecanismos mais utilizados por células diploides para a restauração de danos no DNA (KUPIEC, 2000). Este e outros sistemas foram descritos em todos os seres vivos e a conservação desses sistemas em diferentes espécies, mostrada a partir da caracterização de genes relacionados ao reparo de DNA, demonstra a importância dos mesmos na escala evolutiva (HOEIJMAKERS, 1993 a, b; EISEN; HANAWALT, 1999).

Para determinar mecanismos de ação desconhecidos de substâncias e inferir os tipos de lesões que podem ser gerados pelas mesmas, linhagens de *S. cerevisiae*, sendo uma selvagem proficiente e outra mutante deficiente em uma determinada via de reparação de DNA são expostas a um determinado composto e as suas sensibilidades comparadas (MOUSTACCHI et al., 1983; MELO et al., 1986; PAULA-RAMOS et al., 1991; PASQUAL et al., 1993). Quando a sensibilidade deste mutante deficiente é superior à sensibilidade da linhagem selvagem proficiente na reparação, conclui-se que o composto utilizado gera uma lesão impossibilitada de ser reparada pela linhagem mutante (BOEIRA et al., 2002; ROSA et al., 2004).

Loci descobertos em *S. cerevisiae* foram classificados em três grupos de epistasia, sendo eles compostos por três principais respostas celulares referentes a lesões no DNA (Tabela I): reparo por excisão de nucleotídeos (RAD3), reparação por recombinação ou por quebra de cadeia (RAD52) e reparação pós-replicativa ou mutagênica (RAD6) (FRIEDBERG et al., 1995; NICKOLOFF; HOEKSTRA, 1998; SWANSON et al., 1999). Os genes do grupo RAD3 possuem sensibilidade a mostardas nitrogenadas, metilmetanosulfonato (MMS), radiação UVC e a fotoadição de psoralenos (HENRIQUES; BRENDEL, 1990; PRAKASH; PRAKASH, 2000; BRENDEL; HENRIQUES, 2001). Enquanto mutantes do grupo RAD52 são sensíveis a agentes alquilantes e radiações ionizantes, indutores de quebra dupla do DNA (FRIEDBERG et al., 1995; NICKOLOFF; HOEKSTRA, 1998;

DUDÁS, CHOVANEC, 2004). E por fim, mutantes que apresentam resposta mutagênica diferenciada quando expostos a radiação UVC, psoralenos fotoativados, radiação ionizante e agentes alquilantes são pertencentes ao último grupo, RAD6 (NICKOLOFF; HOEKSTRA, 1998; GAME, 2000).

Tabela I - Grupos de epistasia dos genes de *Saccharomyces cerevisiae* **envolvidos em reparação de danos no DNA.**

Grupo RAD3	Grupo RAD6	Grupo RAD52
RAD1	*RAD5 (REV2) (SNM2)*	*RAD50*
RAD2	*RAD6 (UBC2)*	*RAD51*
RAD3	*RAD8*	*RAD52*
RAD4	*RAD9*	*RAD53*
RAD7	*RAD15*	*RAD54*
RAD10	*RAD18*	*RAD55*
RAD14	*RADH (SRS2)*	*RAD56*
SSL1	*REV1*	*RAD57*
SSL2 (RAD25)	*REV3 (PSO1)*	*RAD58*
TFB1	*CDC9*	*RAD59*
RAD16 (PSO5)	*REV5*	*PSO4 (PRP19)*
RAD23	*REV6*	*RAD24*
CDC8	*REV7*	*XRS2*
CDC9	*CDC7*	
MMS19	*CDC8*	
PSO2 (SNM1)	*MMS3*	
PSO3	*PSO4 (PRP19)*	
UVS12	*UMR-7*	
RAD26		
CDC44		
RFA1		
POL30		

Adaptado de FRIEDBERG et al., (1995), HENRIQUES et al, (1997) e NICKOLOFF; HOEKSTRA, (1998).

1.2 Lesões na molécula de DNA

Mecanismos de reparo de DNA capazes de enfrentar condições adversas - sejam elas induzidas ou espontâneas - foram desenvolvidos pelos organismos para manterem íntegros seus genomas (MILES; SANCAR, 1989). Inúmeras proteínas estão envolvidas no

processo de reparo de DNA, formando complexos utilizados de acordo com a natureza, tipo de dano, fase do ciclo, sua extensão e tipo de célula (BRANZEI; FOIANI, 2009).

O ácido desoxirribonucleico (DNA) está constantemente exposto a agentes que ameaçam ou danificam a sua estrutura, podendo ocasionar diversos tipos de danos (Figura III) ou até mesmo levar à morte celular. Estes danos podem ocorrer em somente uma das fitas ou à fita dupla do DNA, o que depende do agente indutor (CALDECOTT, 2008; KOZAK et al., 2009). O estresse replicativo e o próprio metabolismo celular são exemplos de processos endógenos capazes de induzirem diferentes danos à molécula de DNA. Bases de purina e pirimidina são oxidadas pelas espécies reativas de oxigênio (ERO), que são geradas a partir destes processos, levando essas modificações químicas a serem as que mais ocorrem no DNA (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Consequentemente, a oxidação ocasionada por ERO gera outros tipos de danos, incluindo quebras de fita simples (do inglês - *single strand breaks; SSBs*), oxidação de bases nitrogenadas (DIZDAROGLU, 2015; CADET; WAGNER, 2013). Enquanto lesões no DNA ocasionadas por agentes exógenos podem ocorrer após exposição à radiação UV, poluição atmosférica, quimioterápicos, dentre outros (BJELLAND; SEEBERG, 2003; MORREALL; PETROVA; DOETSCH, 2013).

As SSBs são descontinuidades em somente uma das fitas da dupla hélice do DNA e podem também ocorrer a partir de falhas em processos celulares (por exemplo, falha na atuação da topoisomerase I) e de produtos intermediários de vias de reparo de DNA (por exemplo, reparo de excisão de base (BER)) (CALDECOTT, 2008; YAN; SORRELL; BERMAN, 2014). As SSBs são encontradas principalmente no DNA das mitocôndrias e do núcleo, podendo ocasionar bloqueio da transcrição, ativação excessiva da PARP (proteína envolvida no reparo de DNA) e estresse de replicação do DNA, podendo levar à instabilidade genômica (CALDECOTT, 2008). Trabalhos mostraram que as SSBs estão relacionada ao desenvolvimento de câncer, em doenças neurodegenerativas e insuficiência cardíaca (CALDECOTT, 2008; YAN; SORRELL; BERMAN, 2014; NASSOUR et al., 2016; HIGO et al., 2017; HOCH et al., 2017).

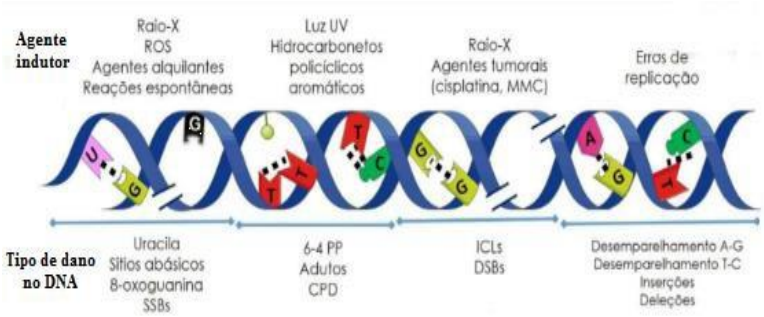
Existem lesões que levam a importantes distorções nas cadeias de DNA. Dímeros de pirimidina (CPDs), as conhecidas ligações covalentes de duas bases pirimídicas – mais frequentes entre timinas -, e os 6-4 fotoprodutos (6-4 PP), que são originados principalmente da exposição à luz ultravioleta, são lesões volumosas e citotóxicas quando em grande quantidade (MOURET et al., 2006) e uma das principais causas para a formação do

câncer de pele (BRASH, 2014). As CPDs formam um anel ciclobutano pela ligação dos carbonos C5 e C6 das duas bases pirimídicas envolvidas. Enquanto os 6-4 PPs envolvem os carbonos C6 e C4 das pirimidinas 5' e 3', respectivamente, formando uma ligação covalente não cíclica (ASAHINA et al., 1999).

Quando o agente causador de dano atinge ambas as cadeias de DNA ocasionando a ruptura da ligação fosfodiéster existente entre elas surge a forma mais deletéria de todas as lesões, as quebras de fita dupla (do inglês - *double strand breaks;* DSBs) (DUEVA; ILIAKIS, 2013). Estima-se que este tipo de dano aconteça em nossas células em torno de 10 vezes em um período de 24 horas (JACKSON; BARTEK, 2009; LIEBER, 2010). As DSBs podem surgir decorrentes de fatores endógenos, como durante processos replicativos celulares (eventos recombinacionais são geradores de quebras), por EROs e por erros durante a atuação da topoisomerase II ou por processos exógenos, como a radiação ionizante (RI) exemplificada pelos raios X e gama (LEHMANN; FUCHS, 2006; KOWALTOWSKI et al., 2009; MURPHY, 2009; ADACHI et. al, 2003). A RI ocasiona DSBs quando em contato com o DNA depois de gerados radicais hidroxila pela radiólise da água (FRIEDBERG, 2003).

Caracteriza-se como aduto estruturas formadas a partir de substâncias químicas capazes de gerar ligações covalentes com as bases nitrogenadas do DNA. Os agentes formadores de adutos podem ser classificados de acordo com a sua capacidade de ligação às moléculas de DNA, podendo ser monofuncionais, ligação com apenas uma base nitrogenada, ou então bifuncionais, quando tem a capacidade de ligação a duas bases nitrogenadas (BELJANSKI et al., 2004). No caso dos agentes bifuncionais, a ligação pode ocorrer entre bases do DNA da mesma cadeia, formando as pontes intracadeia (IaCL) ou entre as cadeias opostas, formando pontes intercadeias (*interstrand crosslink*, ICL) (SCHÄRER, 2005). As principais lesões e os agentes indutores estão representadas na Figura III.

Figura III

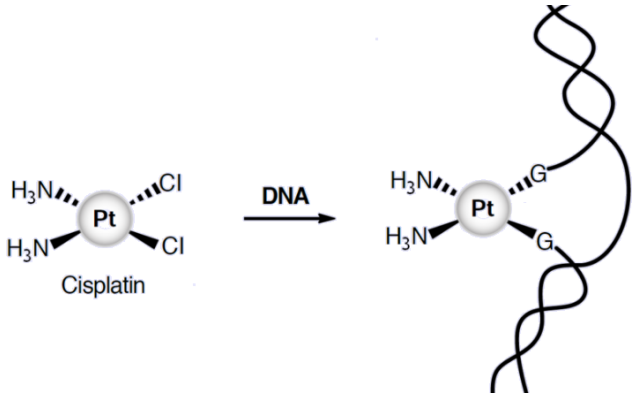


Tipos de danos no DNA gerados a partir de um agente indutor. (Adaptado de HOEIJMAKERS, 2001).

1.2.1 Pontes intercadeia (ICL)

Como exemplo de agente bi-funcional temos a cisplatina (*cis*-diamino-dicloroplatina II; CIS), que desde a sua aprovação em 1978, aparece como um dos antineoplásicos mais eficazes para tratamento de tumores de testículo, ovário, bexiga, cabeça e pescoço (HADDAD et al., 2003). Ela é uma droga poderosíssima apesar de ser uma pequena molécula formada pela ligação de um átomo de platina por grupos cloreto e amina na posição cis (CHIORAZZI et al., 2015) que se liga covalentemente a bases de DNA, formando adutos. A CIS ao interagir com o DNA forma adutos do tipo IaCL e ICL (5 a 8%) ligando-se preferencialmente na posição N-7 de guaninas (Figura IV), (FRANKENBERG-SCHWAGER et al., 2005; TSANG et al., 2009).

Figura IV



Formação de aduto entre cisplatina e DNA. (Adaptado de LIPPERT, 1999).

A mustarda nitrogenada bifuncional também possui a capacidade de ligar-se a duas bases nitrogenadas formando ICLs, que na sua maior parte ocorre com resíduos de guanina em sequências 5'-GNC-3', sendo essa a menor parte das lesões formadas, predominando os monoadutos com 90% das lesões (DRONKERT; KANAAR, 2001; NOLL; MASON; MILLER, 2006). A mecloretamina (HN2), o clorambucil e a ciclofosfamida, que compõem esta classe, possuem um grupamento funcional amino reativo N,N-bis-(2-cloroetil) (NOLL; MASON; MILLER, 2006). A HN2 foi amplamente utilizada em trabalhos como indutor de danos no DNA (POVIRK; SCHUKER, 1994; CIMINO; PAN; HENDERSON, 2013).

Os psoralenos bifuncionais, como o 8-metoxipsoraleno (8-MOP), capazes de formar monoadutos e ICLs, são compostos planares, aromáticos tricíclicos, de origem sintética ou natural. Por possuírem natureza hidrofóbica são capazes de se intercalar entre os pares de bases do DNA e quando expostos a luz UV de 365nm (UVA) ligam-se às bases pirimídicas por ligação covalente, formando diferentes adutos (BETHEA et al., 1999; NOLL; MASON; MILLER, 2006).

Por afetarem alguns processos básicos do material genético, as ICLs são consideradas uma das lesões mais genotóxicas para a célula (BRENDEL; HENRIQUES, 2001; VASQUEZ, 2010). Os agentes indutores destas lesões se unem covalentemente a ambas às cadeias do DNA, impedindo a sua separação e bloqueando, tanto o processo de replicação como o de transcrição, levando à formação de DSBs, que representam uma séria ameaça à viabilidade celular e à estabilidade genômica. (WOOD, 2010). Adicionalmente, as lesões geradas ocasionam mutações no genoma se não reparadas ou quando reparadas incorretamente (BOITEUX; JINKS-ROBERTON, 2013; FINN et al., 2012).

Comparando o ICL formado pela CIS com o formado pela HN2, no primeiro ocorre uma distorção com 79 ° de desenrolamento e 45 ° de curvatura, considerada maior do que do segundo (HUANG et al., 1995). Por se tratar de um tipo de lesão muito complexa, proteínas dos diferentes mecanismos de reparação de DNA contribuem para a correta reparação de ICLs nas células (LEGERSKI, 2010; MACÉ-AIMÉ et al., 2010; SHEN; LI, 2010; VASQUEZ, 2010; WOOD, 2010).

1.3 Respostas a ICL em *S. cerevisiae*

A resposta a ICL em *S. Cerevisiae* envolve a participação de várias vias de reparação que podem sobrepor funções e ainda dependem da fase do ciclo celular envolvida. Em 2001, Grossmann e colaboradores analisaram se a resposta a ICL em *S. cerevisiae* envolvia uma ou mais vias de reparação complexas. Eles construíram linhagens isogênicas mutantes em cada um dos 3 grupos epistáticos de resposta a lesão no DNA, *snm1*Δ, *rev3*Δ e *rad51*Δ, e combinaram essas mutações. Foi observado que esses genes tinham sensibilidade aditiva a lesões ICL, sugerindo que existiam 3 diferentes vias de reparação envolvidas (GROSSMANN et al., 2001).

O gene *SNM1* (*PSO2*) mostrou estar envolvido no reparo de quebras duplas formadas especificamente pelo processamento dos ICLs, ele não interfere na incisão e não tem epistasia com genes da reparação por recombinação homóloga (HR), que reparam quebras duplas (LI; MOSES, 2003), corroborando com os resultados encontrados por Henriques e Moustacchi, (1981) mostraram que uma interação aditiva de PSO2 e RAD52 em fase estacionária (Henriques e Moustacchi, 1981) após tratamento com 8-MOP+UVA, entretanto Munari et al. (2013) mostraram uma interação epistática em fase exponencial (igual alta sensibilidade do simples e duplo mutantes) Estes resultados reforçam a especificidade do ciclo celular no reparo e sugerem que em células em replicação o Pso2p atua na via dependente de Rad52p após ICL foto induzida por 8-MOP. O produto do gene *SNM1* atua no reparo de ICL através de uma atividade 5'- exonuclease de DNA fita simples ou dupla, envolvida no processamento da incisão e possivelmente da forquilha de replicação (LI; HEJNA; MOSES, 2005).

O gene *PSO2* é epistático com genes do grupo RAD3, da via de reparação por excisão de nucleotídeos (NER), via que promove a excisão do ICL, formando quebras simples e duplas intermediárias (GROSSMANN; WARD; MOSES, 2000; HENRIQUES; MOUSTACCHI, 1981; MILLER; PRAKASH; PRAKASH, 1982). As quebras duplas que surgem durante um tratamento com ICL são consequências do processamento das lesões, mas também do colapso da forquilha de replicação com essas lesões, e Pso2 atua de maneira isolada sem se associar com outros fatores de reparo de DSB no processamento das incisões formadas no DNA para remover o ICL (DUDÁŠ et al., 2007).

Em 2005, descobriu-se que existe uma sobreposição funcional das atividades de Pso2 com exonuclease 1 (Exo1) e fatores de reparação de mal pareamento MutS (MMR) no reparo de ICL em células que estão em replicação (fase S do ciclo celular), portanto, NER não é a única via atuante. Além disso, foi visto que a reparação por recombinação homóloga tem papel de reparar as quebras duplas formadas pelo colapso da forquilha de replicação com as lesões ICLs (BARBER et al., 2005). Na fase G1 estacionária, os ICLs formados são reparados através da via NER, que promove a incisão, e por componentes da síntese translesão (STL), que promovem a síntese de nucleotídeos pela Polimerase ζ (zeta), não havendo participação da via por recombinação homóloga nessa fase do ciclo (SARKAR et al., 2006).

Asssim, as principais vias envolvidas na reparação de ICL em *S. cerevisiae* são recombinação homóloga (HR) e reparação por excisão de nucleotídeos (NER), que serão explicadas com mais detalhes nos tópicos à seguir.

1.3.1 Reparo por excisão de nucleotídeo

O mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeo (NER) envolve pelo menos 30 diferentes genes durante o seu processo e atua em variadas lesões que resultam em distorções na dupla hélice de DNA, sendo por isso conhecida como uma das vias existentes mais flexíveis (CLEAVER; LAM; REVET, 2009).

O NER atua, respectivamente, reconhecendo a lesão, realizando uma incisão nas posições 5’ e 3’ da fita (removendo em torno de 12-13 nucleotídeos em levedura), sintetizando a nova cadeia de DNA pelas polimerases utilizando a fita oposta como molde e realizando a ligação do DNA pela DNA ligase (SPIVAK, 2015). NER possui dois subpassos de acordo com a atividade da região genômica a ser reparada, que diferem somente no momento do reconhecimento da lesão: reparo acoplado à transcrição (TCR-NER), que reconhece lesões nas porções do genoma que estão sendo transcritas, e reparo global do genoma (GGR-NER), que reconhece lesões nas regiões silenciosas do genoma (GAILLARD; AGUILERA, 2013).

No GG-NER as lesões são reconhecidas pelas proteínas Rad14, RPA e pelos complexos Rad4/23 e Ras7/Rad16/Elc1 (PRAKASH; PRAKASH, 2000; SPIVAK, 2016). As

lesões que ocorrem nas fitas que estão sendo transcritas são reconhecidas pela própria RNA Polimerase II, no TC-NER, mas para o TCR ocorrer alguns fatores facilitadores e repressores precisam interagir coordenadamente. Vários fatores podem facilitar ou reprimir a TC-NER em *S. cerevisiae*, as proteínas Rad26 (homóloga da CSB humana), Rpb9 (uma subunidade não-essencial da RNAPII) e Sen1 são fatores facilitadores, já as proteínas Spt 4 e 5 (fatores de elongamento transcricional), Rpb4 (subunidade não-essencial da RNAPII) e PAFc são fatores que reprimem a TCR (LI; LI, 2017). Rad26 tem um papel especial, ela estabiliza a parada da RNAPII e posiciona no sítio da lesão (SELVAM et al., 2019). Após o reconhecimento das lesões nos subpassos GG ou TC-NER, o reparo converge para uma mesma via em que o fator de transcrição TFIIH é recrutado para o sítio de lesão e recruta Rad14, que interage com RPA e funciona como uma âncora para recrutar demais proteínas: as helicases Rad3 e Rad25 (também chamadas Ssl2), que atuam desenrolando a fita dupla do DNA; o complexo Rad1/Rad10, que faz a incisão na junção 5' e Rad2, que faz a incisão em 3' (COIN; OKSENYCH; EGLY, 2007; EICHMILLER et al., 2018; GUZDER et al., 2006; HERRERA-MOYANO et al., 2014). Após a remoção da lesão DNA polimerases realizam a síntese de DNA com auxílio de PCNA, RPA e RFC. A última ligação é feita pela DNA ligase Cdc9 (SPIVAK, 2016).

1.3.2 Recombinação Homóloga

A HR 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) reparando com alta fidelidade. É uma via livre de erros e ocorre na fase S e G2 do ciclo celular (LISBY; ROTHSTEIN, 2009; MISTELI; SOUTOGLU, 2009). O complexo MRX (Mre11, Rad50 e Xrs2) é recrutado primeiramente para atuar no reconhecimento da lesão. O processamento das extremidades danificadas é realizado pela proteína Mre11 e Sae2 (*DNA endonuclease SAE2*), gerando uma extremidade de fita simples 3' após a atividade exonucleásica na fita dupla e endonucleásica na fita simples (CANNAVO; CEJKA, 2014). Após esta ressecção, a proteína de replicação A (RPA) se liga na extremidade 3' protegendo e impedindo a degradação desta região (ADKINS et al., 2013). Uma estrutura chamada D-loop é formada após a invasão da fita de DNA lesada em

seu cromossomo homólogo, iniciando a síntese de DNA pela extremidade 3'. A proteína Rad52 é responsável pelo anelamento da outra extremidade da fita lesionada para então ser sintetizada e reestabelecer a integridade genômica (SUGIYAMA; NEW; KOWALCZYKOWSKI, 1998; SUGIYAMA; KANTAKE; KOWALCZYKOWSKI, 2006; RENKAWITZ et al., 2014; LI; HEYER, 2008).

Existem situações em que proteínas de vias de reparação diferentes sobrepõem funções, aumentando a complexidade de atuação do reparo. Exo1, por exemplo, atua nas vias MMR e HR e tem papel redundante com Mre11 na ressecção de quebras duplas formadas por radiação ionizante ou por endonucleases, pois a superexpressão de Exo1 compensa a ausência da atividade exonuclease da Mre11; da mesma forma Pso2 é recrutado para reparar lesões induzidas por radiação ionizante quando não há atividade nuclease de Mre11 (LAM; KROGH; SYMINGTON, 2008; MOREAU; MORGAN; SYMINGTON, 2001). Mutações presentes em genes envolvidos na HR estão frequentemente ligadas à predisposição ao câncer (APARICIO et al. 2014 ; DIGWEED; SPERLING, 2004; LUO et al. 2000; MOYNAHAN; JASIN, 2010).

1.4 Proteína Pso2

A proteína Pso2 é o membro fundador de um grupo distinto dentro da superfamília de meto-b-lactamase (MBL), chamada família b-CASP, de acordo com os nomes de seus membros representantes ativos (CPSF, Artemis, SNM1, Pso2) que atua em ácidos nucleicos (BRENDEL; HENRIQUES, 2001; CALLEBAUT et al., 2002; BRENDEL et al., 2003; BONATTO et al., 2005; DOMINSKI, 2007; CATTELL et al., 2010). Esta proteína foi identificada inicialmente em *S. cerevisiae* e se mostrou envolvida na reparação de danos induzidos por agentes bi-funcionais, mesmo não fazendo parte de nenhuma das vias de reparação (HENRIQUES; MOUTACCHI, 1980; RUHLAND et al., 1981; HENRIQUES et al., 1997; BARBER et al., 2005). Em humanos foram identificadas cinco proteínas ortólogas para Pso2, sendo três atuando no metabolismo do DNA (SNM1A, SNM1B/Apolo e SNM1C/Ártemis) e duas no metabolismo do RNA (Elac2 e CPSF).

O gene *PSO2* codifica uma proteína nuclear de 76 kDa, que atua principalmente na reparação de ICLs. Primeiramente, Pso2 foi identificada como uma 5'- exonuclease em *Saccharomyces cerevisiae* (LI et al., 2005). Alguns anos depois, Tiefenbach e Junop

(2012) relataram uma atividade de endonuclease específica para a reparação de hairpins de DNA em leveduras. Os mutantes de levedura Pso2 possuem uma característica única, que é a sua hipersensibilidade aos compostos de psoraleno, bi e polifuncional fotoativados, com uma sensibilidade menor aos agentes monofuncionais, radiação ionizante (RI), luz UVC (254 nm) e HO endonuclease (LI; MOSES, 2003).

A maioria das ICLs é reparada durante a fase S, quando o colapso da forquilha de replicação encontra uma ICL e desencadeia a maquinaria de reparação, como resultado de uma quebra dupla na fita de DNA. O requisito específico para a Pso2 na reparação de ICL sugere que as DSBs formadas durante este processo podem ser diferentes de outras formas de quebras de DNA (MUNARI et al., 2012). Pso2 pode funcionar no processamento de extremidades de DNA para gerar substratos adequados para o processo de reparo, como já foi proposto anteriormente (HO; SCHÄRER, 2010; MAGAÑA-SCHWENCKE et al., 1982). A atividade exonuclease de Pso2 é a mais descrita na literatura, contudo não explica completamente como as lesões ICL são removidas, já que faltaria uma atividade nuclease translesão, porém em um estudo recente descobriu-se que Pso2 recebe estímulo da helicase Herq1 para ter atividade nuclease translesão em um sítio específico da ICL (ROGERS et al., 2020). No entanto, sua função precisa ainda não está definida e há muitos aspectos a serem esclarecidos sobre a função da Pso2 no reparo de ICL, incluindo o reconhecimento de novos parceiros, tais como as proteínas que atuam no reparo de quebras duplas na molécula de DNA.

1.4.1 Estrutura 3D da proteína Pso2

A Bioinformática abrangendo diversas ciências como biologia, física e química, tornou-se uma importante ferramenta para análise de dados biológicos em grande escala, atuando cada vez mais na simulação de experimentos *in silico***.** O principal e mais volumoso banco de dados de estruturas proteicas, o Protein Data Bank (PDB) (BERMAN et al., 2000), oportuniza a busca e inserção de dados por pesquisadores que através de ferramentas bem desenvolvidas, promovem avanço no conhecimento de diversos processos biológicos, como as interações proteína-proteína (LUSCOMBE et al., 2001).

As regiões funcionais de uma proteína formam-se com os principais resíduos ocupando posições corretas após a dobra da estrutura, posições estas que, na sua maioria, são

regiões que interagem com outra proteína. A estrutura 3D de uma proteína é tão importante na determinação de sua função quanto sua sequência de aminoácidos (LESK, 2001).

1.5 Complexo MRX

O complexo MRX (MRN em humanos), conforme citado anteriormente, é formado pelas proteínas Mre11, Rad50 e Xrs2. Os genes que codificam estas proteínas foram identificados em *S. cerevisiae* durante triagens genéticas para mutantes sensíveis a agentes que danificam o DNA (*RAD50* – GAME; MORTIMER, 1974; *XRS2* – IVANOV et al., 1992; *MRE11* – AJIMURA et al., 1993). Além da sensibilidade genotóxica que os mutantes destes genes apresentam, defeitos meióticos e o encurtamento de telômeros também são consequências preocupantes (BORDE, 2007; GOBBINI et al., 2016). Resposta a danos no DNA, detecção e reparo de DSBs, ativação da homeostase Tel1/ATM quinase e comprimento telomérico são algumas das principais funções desempenhadas por estas proteínas (STRACKER; PETRINI, 2011). Umas das funções bioquímicas do complexo MRX é a capacidade de realizar incisões no esqueleto fosfodiéster do DNA com sua atividade endonucleásica (RUPNIK et. al, 2010).

A proteína Mre11 é o primeiro fator a detectar os sítios de DSBs no DNA. Ela é uma nuclease e em conjunto com a proteína Sae2 promove o passo inicial da via de ressecção final do DNA, clivando endonucleoliticamente a cadeia terminada em 5' em um local interno ao DSB (CANNAVO; CEJKA, 2014). Mre11 e Rad50 são evolutivamente conservadas e formam uma nuclease regulada por ATP (STRACKER; PETRINI, 2011). Xrs2 é necessária para a localização nuclear de Mre11 e trabalhos mostraram sua interação proteína-proteína, sugerindo que ela funcione como uma proteína de suporte (CARNEY et al., 1998; TSUKAMOTO et al., 2005).

Em um estudo recente que avaliou a expressão das subunidades de MRN (Mre11, Rada50 e Nbs1 (ortóloga humana da Xrs2)) através de Western blot em células HeLa após tratamento com dois indutores de ICL foi observado um significativo aumento da expressão das proteínas Mre11 e Rad50, em dependência da dose de cisplatina (10μM à 50μM), e no nível de Nbs1quando exposto à mitomicina C, indicando uma atuação e participação fundamental deste complexo no reparo deste tipo de lesão (PASADI; MUNIYAPPA, 2020).

1.6 Proteína Kin3

A proteína Kin3 é a única proteína em *S. cerevisiae* estruturalmente relacionada à proteína NIMA (*never in mitosis A*), codificada em *Aspergillus nidulans*, que realiza um papel essencial na entrada da mitose (OSMANI et al., 1991). NIMA é uma proteína pertencente à família NRK (*NIMA-related kinases*) que contempla serinas/treoninas cinases com a função principal de organização do ciclo celular (MORRIS, 1975; OAKLEY; MORRIS, 1983). Onze proteínas ortólogas à NIMA foram identificadas em humanos, denominadas de Nek1 a Nek11. A similaridade sequencial ao domínio cinásico da NIMA é em torno de 40% (SCHULTZ; NIGG, 1993). Dentre as Nek's, a proteína Nek2 possui maior similaridade sequencial com a Kin3 (CHEN et al., 2008; O'CONNELL; KRIEN; HUNTER, 2003).

O gene *KIN3* foi identificado em um trabalho que investigou, em uma biblioteca de DNA genômico de leveduras, regiões conservadas do domínio catalítico de serinas/treoninas cinases (JONES; ROSAMOND, 1990). Com um peso molecular de 51,2 KDa, Kin3 é formada por 435 aminoácidos, localizando-se no cromossomo I (BARTON et al., 1992). Nosso grupo de trabalho demostrou que a deleção do gene *KIN3* proporciona uma sensibilidade maior quando estas linhagens são tratadas com cisplatina, mostarda nitrogenada, MMS e 24 doxorubicina, que são agentes genotóxicos indutores de ICL e adutos. A resposta da linhagem selvagem a um agente genotóxico apresenta acúmulo de *KIN3* em G2/M incentivando a atuação das proteínas de reparo através do remodelamento da cromatina e a ativação da parada do ciclo celular. Como na *kin3Δ* não ocorre este acúmulo, uma falha na parada de ciclo celular para este mesmo ponto de checagem pode estar ocasionando esta sensibilidade, mantendo a existência de quebras. O aumento da expressão da proteína Kin3 após estes tratamentos evidencia a importância dela no reparo e sinalização. Ainda, buscando identificar a proteína Kin3 na resposta aos danos no DNA, experimentos de duplo híbrido foram realizados demonstrando a interação física de Kin3 com as proteínas do complexo MRX. Os agentes genotóxicos indutores de ICLs utilizados foram o 8-metoxipsoraleno foto-ativado, a mostarda nitrogenada e a cisplatina, constatando epistasia entre os mutantes *kin3Δ* e *mre11Δ*, *rad50Δ* e *xrs2Δ* (MOURA, et al., 2010).

Estes resultados apresentados indicam uma provável atuação da proteína Kin3 em conjunto com o complexo MRX na detecção de ICLs quando a lesão é ocasionada na fase G2/M do ciclo celular, fazendo parte da via de recombinação homóloga.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Propor um modelo estrutural usando ferramentas in sílico para a proteína Pso2 e avaliar a interação da proteína Pso2 com o complexo MRX e com a proteína Kin3, após tratamento com CIS, usando abordagens genéticas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Propor uma estrutura 3D para a proteína Pso2.
- ✓ Construir duplos mutantes *kin3Δpso2Δ, rad50Δpso2Δ, xrs2Δpso2Δ and mre11Δpso2Δ* das proteínas Pso2, Mre11, Rad50, Xrs2 e Kin3 através de disrupção gênica.
- ✓ Avaliar perfil de sensibilidade após tratamento agudo (2 horas) e crônico (24 horas).
- ✓ Avaliar a expressão dos genes *EXO1*, *MRE11* e *DNA2*

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Pso2 protein in interstrand crosslink response: new insights

Running Title: **Pso2 protein: new insights**

Artigo a ser submetido para: Yeast

Endereço eletrônico da revista: https://onlinelibrary.wiley.com/journal/10970061

Pso2 protein in interstrand crosslink response: new insights

Running Title: **Pso2 protein: new insights**

Thais Raupp Azevedo[1], Pablo Ricardo Arantes[1], Paula Pellenz Tomasini[1], Jenifer Saffi[1], João Antonio Pêgas Henriques[2,3*], Dinara Jaqueline Moura[1*]

[1]Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

[2]Department of Biophysics / Biotechnology Center, Institute of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

[3]Cell Culture Laboratory, Postgraduate Program in Biotechnology, University of Vale do Taquari, Lajeado, Brazil.

Correspondence author

Dinara Jaqueline Moura, Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA)

Porto Alegre, RS, Brazil

Email: dinaram@ufcspa.edu.br

João Antonio Pêgas Henriques, Department of Biophysics / Biotechnology Center, Institute of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS)

Porto Alegre, Brazil

Email: henriques@innvitro.com

KEYWORDS: Pso2 protein; 3D structure of Pso2 protein; MRX complex; Kin3 protein; phenotype reversal; up regulation *EXO1* and *MRE11*.

TAKE AWAY

Construction of the 3D structure of the Pso2 protein.

Reversal of the sensitivity in double mutants after treatment with cisplatin.

Mutant *pso2*Δ shows upregulation of *MRE11* and *EXO1* genes.

ABSTRACT

The interstrand crosslink (ICLs) affect some basic processes of genetic material. The antineoplastic cisplatin (CIS) is a bi-functional agent that covalently binds to DNA bases and can form ICL. The Pso2 protein has been shown to be involved in repairing damage induced by bifunctional agents. The MRX complex (Mre11, Rad50 and Xrs2) is involved in the response to DNA damage. The *KIN3* gene mutant strains are sensitive to different DNA damage adducts agents and Kin3p and MRX proteins interact genetically in an epistatic manner after mutagenic stress. In this work, we propose a 3D model of the structure of Pso2 and verify the genetic interaction of this protein with the MRX complex and Kin3, during treatment with CIS. Survival curves to assess the sensitivity of single and double mutants of these proteins were performed in strains of *Saccharomyces cerevisiae* in different concentrations of cisplatin, for 2 hours and 24 hours. The simple mutants *pso2*Δ, *rad50*Δ and *mre11*Δ showed a similar reduction in survival in both treatments, diverging from *kin3*Δ and *xrs2*Δ. On the other hand, the double mutants *kin3*Δ*pso2*Δ, *rad50*Δ*pso2*Δ, *xrs2*Δ*pso2*Δ and *mre11*Δ*pso2*Δ showed high survival after 2 hours treatment and decreased survival when exposed to 24 hours, except for *rad50*Δ*pso2*. To understand the reversal of sensitivity in the double mutants, we evaluated the expression of the *MRE11*, *DNA2* and *EXO1* nucleases in the *xrs2*Δ, *pso2*Δ and *xrs2*Δ*pso2*Δ strains. The results of the *EXO1* and *MRE11* expression in *pso2*Δ indicate a common substrate between these genes and the performance of these proteins in different pathways.

1 INTRODUCTION

The interstrand crosslink (ICLs) affect some basic processes of genetic material, so they are considered one of the most genotoxic lesions for the cell (Brendel & Henriques, 2001; Vasquez, 2010). The agents that induce these lesions covalently attach to both DNA strands, preventing their separation and blocking both the replication and transcription processes, leading to the formation of double strand breaks (DSBs), which represent a serious threat to cell viability and genomic stability (Wood, 2010). The cisplatin antineoplastic (cisdiaminodichloroplatin II; CIS) is a bi-functional agent used to treat tumors of the testis, ovary, bladder, head and neck (Haddad et al., 2003) which covalently binds to DNA bases and may form adducts of the ICL type, binding preferably in the N-7 position of guanines (Frankenberg-Schwager et al., 2005; Tsang, Al-Fayea, & Au, 2009).

The *PSO2* gene encodes a nuclear protein of 76 kDa, which acts mainly in the repair of ICLs. First, the Pso2 protein was identified as a 5'-exonuclease in *Saccharomyces cerevisiae* (LI et al., 2005). Subsequently, Tiefenbach and Junop (2012) reported a specific endonuclease activity for the repair of DNA hairpins in yeasts. Pso2 was shown to be involved in the repair of damage induced by bifunctional agents, even though it is not part of any of the repair pathways (Barber, Ward, Hartley &McHugh, 2005; Henriques & Moutacchi, 1980; Henriques, Brozmanová & Brendel, 1997; Ruhland, Haase, Siede & Brendel, 1981). The specific requirement for Pso2 in repairing ICL suggests that the DSBs formed during this process may be different from other forms of DNA breakage (Munari et al., 2014). It is known that Pso2 acts in the processing of DNA ends to generate suitable substrates for the repair process (Ho & Scharer, 2010; Magaña-Schwencke, Henriques, Chanet & Moustacchi, 1982) and that it receives a stimulus from the helicase Herq1 to have nuclease activity on a specific ICL site (Rogers et al., 2020).

One of the complexes involved in DNA damage response is MRX (Krogh et al., 2005). Mre11p displays 3’-5’ single-strand (ssDNA) and double-strand DNA (dsDNA) exonuclease activity, ssDNA endonuclease activity, a limited DNA unwinding activity, and it can bind to both ssDNA and dsDNA (Furuse et al., 1998; Moreau, Fergunson & Syminton, 1999). Rad50p exhibits ATP-dependent binding

to dsDNA involving protein dimer formation (Raymond & Kleckner, 1993). Xrs2p show DNA binding activity and enhances the Mre11p nuclease activity (Trujillo, 2003). Although both Pso2 and the 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 (Munari et al., 2014) showed the non-epistatic interaction between *PSO2* and *MRE11* genes, suggesting that they compete for the same substrate.

Our research group showed that Kin3p and MRX complex proteins interact genetically in an epistatic way after mutagenic stress, and this response seems to be dependent of Tel1/Mec1 pathway (submitted manuscript). *KIN3* gene mutant strains are sensitive to several mutagenic agents, and Kin3p deficient cells are defective in G2/M-phase checkpoints in response to DNA damage (Moura et al., 2010)

Seeking to expand the knowledge about the Pso2 protein, in this study we proposed a 3D model of Pso2 structure and verified the genetic interaction of this protein with the MRX complex and Kin3 protein, after treatment with CIS, using genetic approaches.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Construction of the Pso2 protein structure

The structure of the Pso2 protein was performed using the technique of comparative molecular modeling and *ab initio* modeling. The protein was modeled using the structure found under the code PDBs 4B87. The Robetta server (Kim, Chivian, & Baker 2004) was used, having the amino acid sequence of the Pso2 protein as input. Five models were built. Thus, among the 5 structures built, the model selected was the one that had the best score in the evaluation of stereo-chemistry [analyzed with the PDBsum server and the PROCHECK program (Las-kowski 2001)].

2.2 Culture media and *Saccharomyces cerevisiae* strains

Cultures of yeast cells occurred in a YEPD rich medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) plus 2% agar when solidified for plating. For growth with omission of amino acids, the minimum medium (MM) was used, composed of 0.67% YNB (yeast nitrogen base), 2% glycoside, 1% ammonium sulfate and 40 mg.ml -1 of each required amino acid (Burke et al., 2000). The strains of *S. cerevisiae* used in this study are described in Table 1.

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

Strain	Genotype	Source
BY4741	*MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0*	Euroscarf
kin3Δ	BY4741; *kin3::kanMX4*	Euroscarf
mre11Δ	BY4741; *mre11::kanMX4*	Euroscarf
rad50Δ	BY4741; *rad50::kanMX4*	Euroscarf
xrs2Δ	BY4741; *xrs2::kanMX4*	Euroscarf
pso2Δ	BY4741; *pso2::kanMX4*	Euroscarf
kin3Δmre11Δ	BY4741; *kin3::ura3; mre11::ura3*	DJ Moura
kin3Δpso2Δ	BY4741; *pso2::leu2; kin3::ura3*	This work
xrs2Δpso2Δ	BY4741; *pso2::leu2; xrs2::his3*	This work
mre11Δpso2Δ	BY4741; *pso2::leu2; mre11::ura3*	This work
rad50Δpso2Δ	BY4741; *pso2::leu2; rad50::ura3*	This work

2.3 Gene disruption: cell amplification and transformation

The constructions of the double mutants of *S. cerevisiae* were performed through gene disruption, using a disruption cassette, according to Burke et al (2000). The plasmid YCPLac33 used for the amplification of *kin3::URA3*, *mre11::URA3*, and*rad50::URA3* cassettes, the plasmid pGADT7 for amplification of *pso2::LEU2* cassette, and pGBKT7 for amplification of *xrs2::HIS3* cassette. The amplifications were made using a high fidelity thermostable DNA polymerase (Platinum®Taq Invitrogen). All double mutants were transformed by lithium acetate method (Gietz & Schiestl 2007) using this linear disruption constructs.

For the cell transformation process, cells were inoculated in 5 ml of YEPD and incubated overnight at 200 rpm/30°C. In 50 ml of pre-heated YEPD, $5x10^6$ cell/ml were again inoculated and incubated for another 5 hours in the same conditions so that the cells reached a cell density around $2x10^7$ cell/ml (Gietz & Schiestl 2007). Then, the inoculum was centrifuged for 5 minutes at 4000rpm/20°C, washed with sterile distilled water, centrifuged again and the pellet resuspended in 1 ml of sterile distilled water. The transformation mix composed of Polyethylene Glycol 3500 50% W / V, lithium acetate, denatured salmon DNA and the disruption cassette was added to 100 µl of the pellet. After, 40 minutes at 42 ° C the mixture was incubated, followed by washing and cultivated in a plate with respective selective medium for 48/96 hours. PCR transformation check was performed to confirm genetic disruption.

2.4 Survival curves

Stationary phase cells were obtained by inoculation of an isolated single colony into liquid YPD. After 48 hours, cells were washed in 0.9% NaCl and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS; Na2HPO4 and NaH2PO4; 20 mM; pH 7.4) to a titer of $1x10^9$ cells/ml. In order to evaluate sensitivity to cisplatin (CIS), $1x10^8$ cells/mL were treated in PBS with different concentrations of CIS (50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM and 1000 µM) for 2 hours or 24 hours, at 30°C under agitation. 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. Colonies were counted and the estimated percentage of survival was determined based on the negative control plate, considered 100% survival.

2.5 RT-PCR analyses

For *EXO2, MRE11 and DNA2* expression, cells were harvested for total RNA extraction using the SV Total RNA Isolation System (PROMEGA®) according to the manufacturer's instructions. M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) was used to synthesize a complementary DNA strand from single-stranded RNA and SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™) was used for RT-qPCR using specific primers for *nucleases*or*ACT1* (Table 2) using StepOne™ Real-Time PCR System. Results were expressed as 2-ΔCT.

Table 2 - Primer sequences used to perform RT-PCR.

NAME	Sequence
EXO1	Forward: 5'-TTTCCGAGTCTCAACTATCTACAC-3′ Reverse: 5′-GCCATCACCGTCATCATCTG-3′
MRE11	Forward: 5'-ATTTCTATTCCCGTATTCGGCA-3′ Reverse: 5′-TTAAACCATTCACCTTCTCGCA-3′
DNA2	Forward: 5'-CGATTTGCCATCTTCACCCA-3′ Reverse: 5′-TCATTCTTCCCACAACTTTCCT-3′
ACT1	Forward: 5′-ATGGAAGATGGAGCCAAAGC-3′ Reverse: 5′-TCTGCCGGTATTGACCAAAC-3′

2.5 Statistical analysis

The results are presented by arithmetic mean with their respective standard deviation (x ± sd) and were evaluated using two-way Anova (Two Way), followed by Bonferroni's post-test, in the statistical program Prism GraphPad version 5.0.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 3D structure of the Pso2 protein

Bioinformatics, covering several sciences such as biology, physics and chemistry, has become an important tool for the analysis of biological data on a

large scale, acting increasingly in the simulation of in silico experiments (Berman et al., 2000). The necessary dependencies of a protein are formed with the main residues occupying correct positions after folding the structure, the positions of which, for the most part, are regions that interact with another protein. The 3D structure of a protein is as important in determining its function as its sequence of amino acids (Lesk 2001).

In this work, first, was obtained a complete model for Pso2 protein through comparative modeling and ab initio modeling. Thus, for the construction of the model, the modeling was performed using the Robetta server (Kim et al., 2004).

After the server generated 5 models, these were analyzed stereochemically by the PROCHECK software and the model with the highest amount of waste in permitted regions was selected (Figure 1).

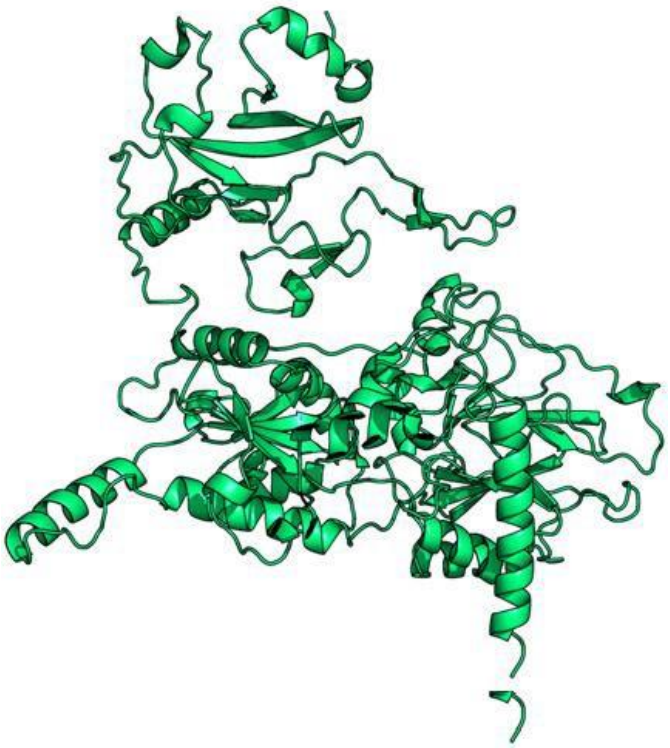


Figure 1: 3D structure of the Pso2 protein.

To evaluating the model with the highest amount of residues in permitted regions, the protein that had a lower RMSD (Root Mean Square deviation) value was compared when compared to the mold (PDB 4B87), indicating a high similarity between the structures (Figure 2).

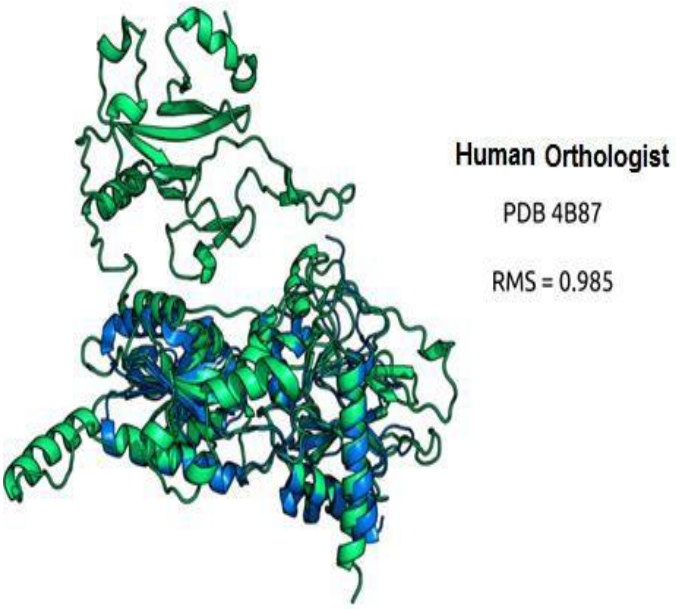


Figure 2: Three-dimensional structures of the constructed Pso2 model (green) and the human orthologist used as a mold (blue). The RMSD value is demonstrated, confirming the similarity between the structures.

In the Z-score analysis shown in Figure 3, the negative value shown is the expected value for a good model. When comparing with the crystal used as a mold, the Z-score values are awfully close to the model (approximately -9), reinforcing that the structure of the constructed Pso2 is correct. Another important data is the point corresponding to the model (black), being close to the light blue region that corresponds to other structures deposited in the database, which have the same size.

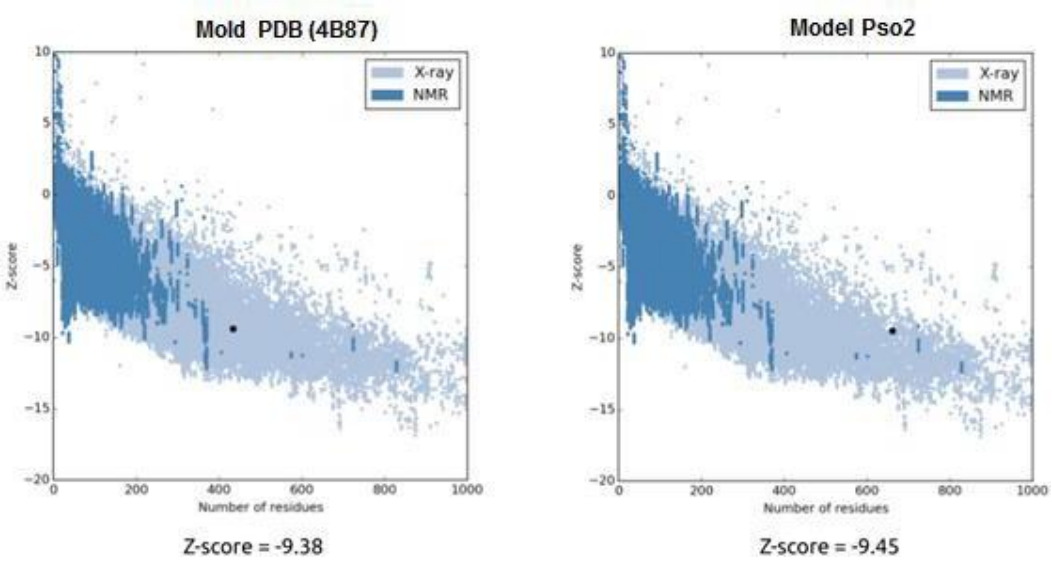


Figure 3: Z-score analysis for the crystal used as a reference in the construction of the model. And on the right, analysis of the model obtained.

The results of the Ramachandran graphs (Figure 4), or analysis of the dihedral angles ϕ and Ψ for the protein amino acids, demonstrated that the model presents good results when compared to the crystal used as a model for modeling. It is possible to verify that there is a similar number of residues in favorable regions in the model, when compared to the crystallographic structure. Waste in unfavorable regions also shows a similar result, in the model obtained, with less waste in those regions. With these results added to the Z-score, it is possible to infer that the model obtained has a good resolution compared to the crystals of the human orthologist.

The lack of information about the 3D structure of the Pso2 protein makes it impossible for us to make some advances in the Bioinformatics area to elucidate possible protein-protein interactions. Then, the knowledge of this structure favors the elucidation of processes where both the function of the protein and the ability to interact between them is important.

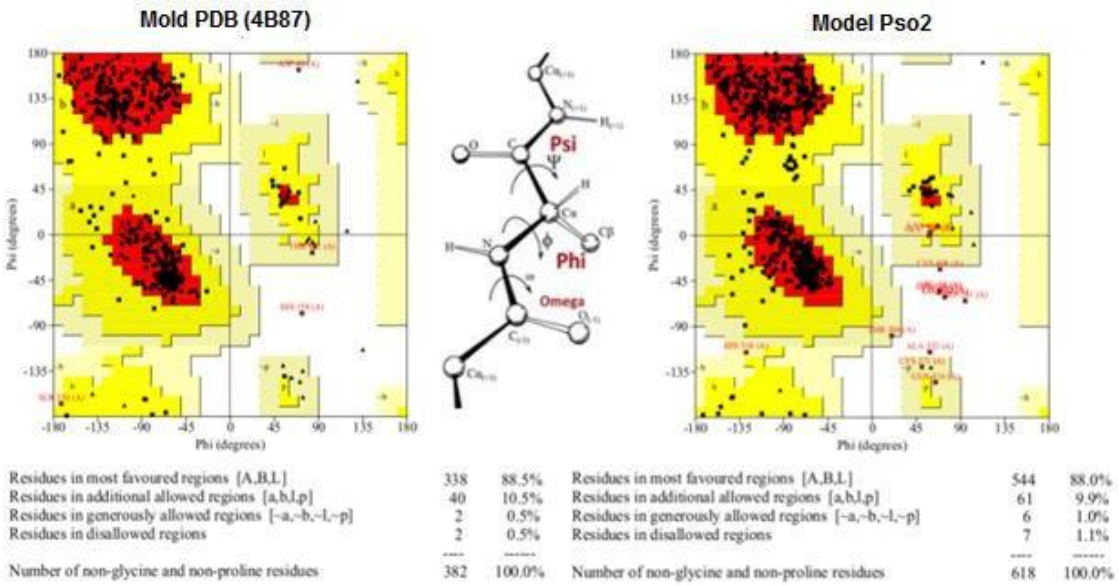


Figure 4: Ramachandran graphics for the crystal and the built model of Pso2.

3.2 Survival of mutant strains after treatment with cisplatin

Survival curves to assess the sensitivity of the strains to different concentrations of CIS were performed for different periods, 2 hours and 24 hours. In both treatments, the *pso2*Δ strain shows decreased survival when compared to the wild strain BY4741, followed by *rad50*Δ and *mre11*Δ (Figure 5). These 3 strains showed a similar profile of decreased survival. This *pso2*Δ hypersensitivity phenotype confirms results already presented in previous studies (Henriques et al., 1997; Henriques & Brendel 1990; Munari et al., 2014). By increasing the time of exposure to CIS to 24h, the sensitivity of all strains increased and Pso2 remained the most sensitive strain, followed by *rad50*Δand *mre11*Δ, indicating a treatment-dependent response.

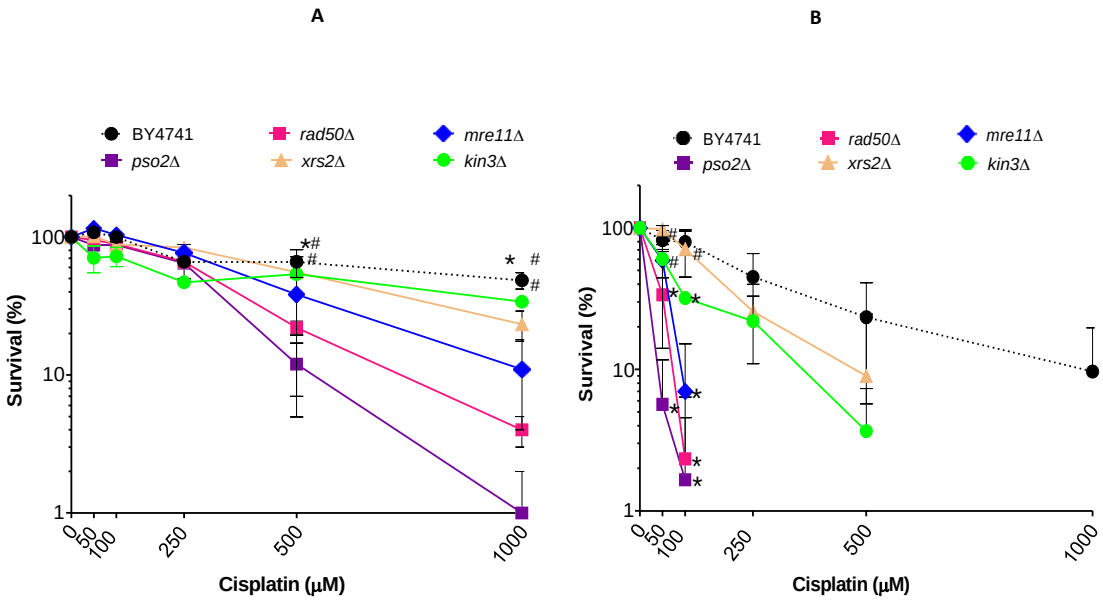
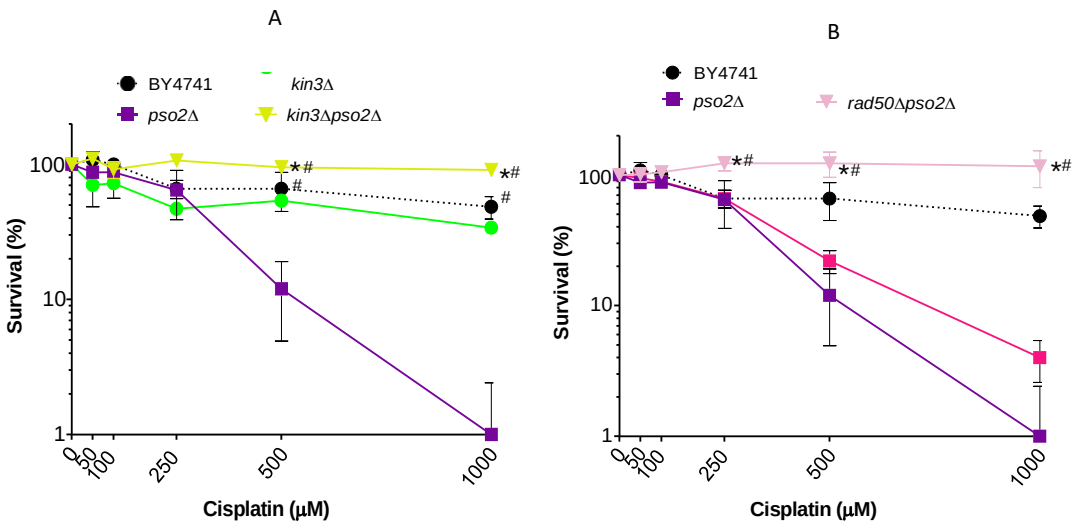


Figure 5: Survival curves of *pso2*Δ*, xrs2*Δ*, kin3*Δ*, mre11*Δ *and rad50*Δ strains at different concentrations of cisplatin (50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM and 1000 µM) for a period of 2 hours (A) and 24 hours (B) (Data expressed as mean ± SEM. * Indicates p <0.05 in relation to BY4741, and # Indicates p <0.05 in relation to Pso2, by Two Way ANOVA, post hoc Bonferroni).

It has been implied, mostly based on correlative data, that the MRN complex may have a role in DNA ICL repair consistent with its known functions in DNA damage repair (Syed & Tainer, 2018). To evaluate a possible interaction between Pso2 proteins, MRX complex and Kin3 in the same ICL repair pathway, double mutants were constructed and treated with cisplatin for 2 hours (Figure 6). The results indicate a non-epistatic interaction between *PSO2* and *KIN3, MRE11, RAD50* or *XRS2* genes (Figure 6), since all double mutants showed no sensitivity to cisplatin treatment, with a survival similar to the wild strain and quite different from the simple *pso2*Δ mutant. The non-epistasis of the *RAD50* and *XRS2* genes with *PSO2* genes differs from that presents by Munari et al. (2013), which suggests that Pso2p, Xrs2p and Rad50p are acting in the same repair pathway for the repair of DNA-ICL lesions, since similar sensitivity was observed to the single mutants *xrs2*Δ, *rad50*Δ, *pso2*Δ, and double mutants *rad50*Δ*pso2*Δ and *xrs2*Δ*pso2*Δ after exposition to 8-MOP+UVA. A possibility of this difference may be associated with the type of damage inducer used, since CIS can react with DNA forming

monoadducts and bi-adducts, as DNA interstrand cross-links and mainly DNA intrastrand cross-links (Lippert, 1992; Flchtlnger-schepman, Van Dijk-knijnenburg, Van Der Velde-visser, Berends, & Baan 1995), while bifunctional furocoumarin 8-MOP in eukaryotic cells intercalates into DNA and undergoes photocycloaddition with pyrimidines to form monoadducts and interstrand cross-links (ICLs) and some oxidative damage (Noll, McGregor Mason, & Miller 2006). Another important aspect to be considered is the complexity of cisplatin toxicity mechanisms. Cisplatin was shown to strongly inhibit the catalytic activity of purified human DNA topoisomerase IIα (topo II) (Cantero et al., 2006). Perhaps in the double mutants, the ICLs are not the most important lesions, and it is possible that the lesions will be inhibited/processed in relation to Topo II, triggering other repair pathways independent of Pso2 and the MRX complex, such as translesion synthesis, for example.

Regarding the result of the *MRE11* and *PSO2* mutants, the findings were like Munari et al. (2013), showing a non-epistatic interaction between the mutants, indicate they are not acting on the same pathway repair.



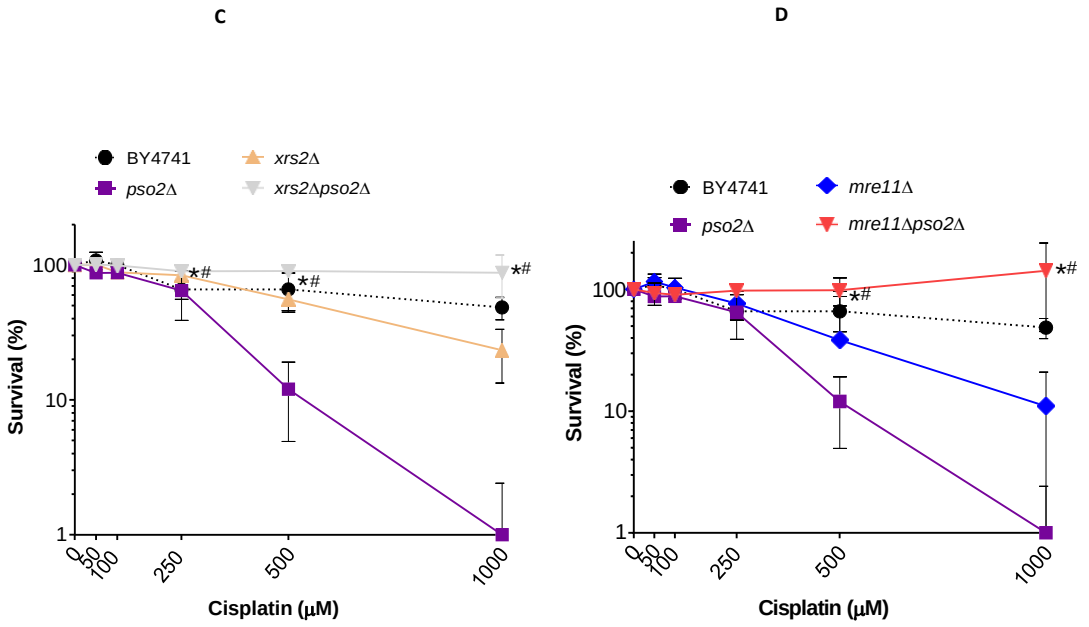


Figure 6: Survival curves of the *kin3Δpso2Δ, rad50Δpso2Δ, xrs2Δpso2Δ and mre11Δpso2Δ* strains at different concentrations of cisplatin (50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM and 1000 µM) for a period of 2 hours (Data expressed as mean ± SEM. * Indicates p <0.05 in relation to BY4741, and # Indicates p <0.05 in relation to Pso2, by ANOVA Two Way, post hoc Bonferroni).

When the double mutants were treated for 24 hours (Figure 7), the *kin3Δpso2Δ*, *xrs2Δpso2Δ* and *mre11Δpso2Δ* (Figure 7A, 7C and 7D) strains showed a slight decrease in survival, in contrast to the simple *pso2Δ, rad50Δ* and *mre11Δ* mutants that showed an increase in sensitivity. Interestingly, according to the result shown by Munari et al. (2014) the *rad50Δpso2Δ* (Figure 7B) mutant was sensitized after this greater exposure to CIS, showing a lower survival than the wild strain BY4741.

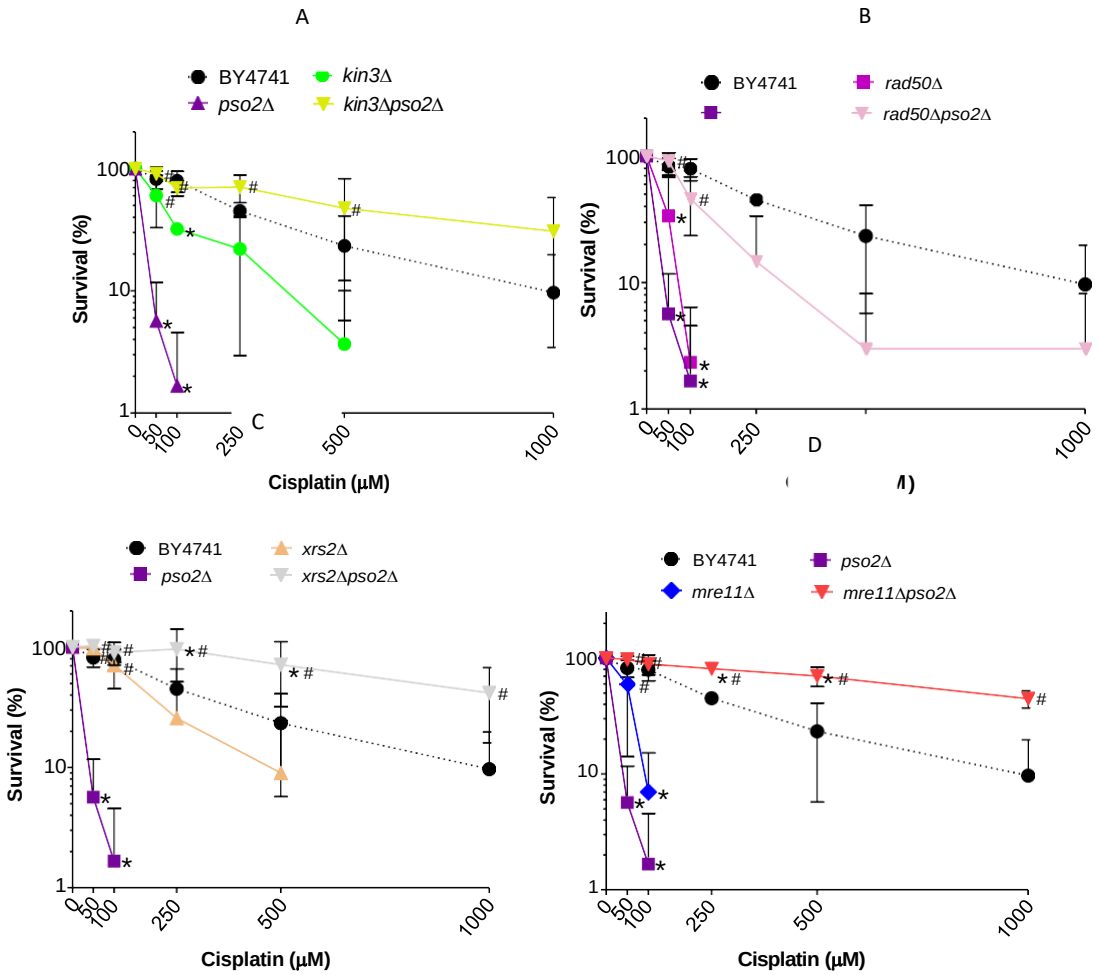


Figure 7: Survival curves of the *kin3Δpso2Δ, rad50Δpso2Δ, xrs2Δpso2Δ and mre11Δpso2Δ* strains at different concentrations of cisplatin (50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM and 1000 µM) for a period of 24 hours (Data expressed as mean ± SEM. * Indicates p <0.05 in relation to BY4741, and # Indicates p <0.05 in relation to Pso2, by ANOVA Two Way, post hoc Bonferroni).

To understand this reversal of sensitivity in the double mutants, we evaluated the expression of the *MRE11*, *DNA2* and *EXO1* nucleases in the *xrs2Δ*, *pso2Δ* and *xrs2Δpso2Δ* strains (Figure 8). The results show that the double mutant *xrs2Δpso2Δ* shows greater expression of the exonucleases genes, interesting to note that the simple mutant of *xrs2Δ*does not behave like this, it is very close to wild type strain (BY4741). However, the simple mutant *pso2Δ* has the same ex-

pression pattern as the double (for *EXO1* and *MRE11*). It seems that only the deletion of *PSO2* already has some effect, but when double the*XRS2* is also deleted it enhances.

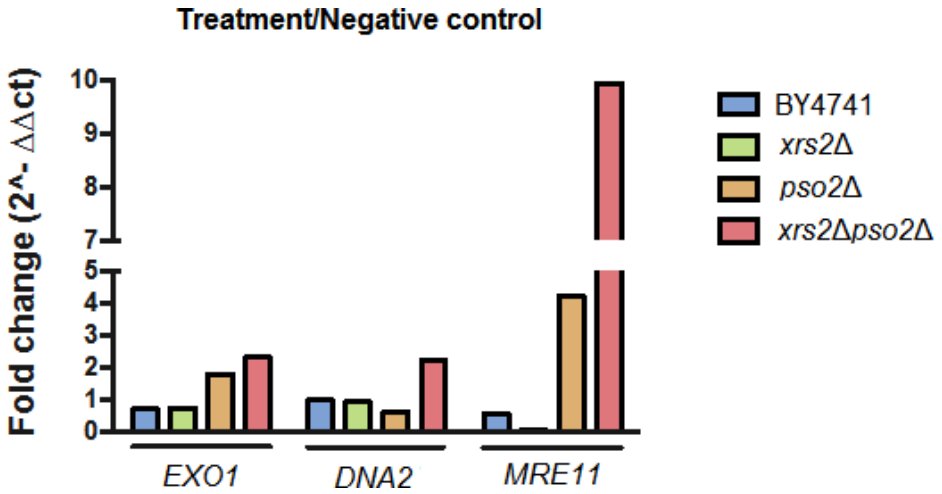


Figure 8: Gene expression of EXO1, DNA2 and MRE11 in the treatment group in relation to negative control (2^-ddct= 1 equal expression; 2^-ddct<1 downreguation; 2^-ddct>1 upregulation).

The results of *EXO1* and *MRE11* expression in *pso2*Δ indicate a common substrate between these genes and the performance of these proteins in different pathways, in agreement with Lam, Krogh & Symington 2008 after treating *pso2*Δ, *exo1*Δ*pso2*Δ and *mre11-H125N*Δ*pso2*Δ mutants (defective nuclease in *mre11*) with cisplatin and an increase in sensitivity of the double mutants in relation to *pso2*Δ.

Among all the DNA lesions, interstrand crosslinks are complex lesions that covalently link both strands of an undamaged DNA duplex. Thus, removal of this type of lesion involves unhooking by dual endonucleolytic incisions; consequently, their removal depends on the interplay among different enzymes and accessory proteins of multiple DNA repair pathways, including mismatch repair, homologous recombination (HR), double strand break (DSB) repair, transcription coupled nu-

cleotide excision repair and base excision repair (reviewed by Pasadi & Muniyappa, 2020).

Further analysis is needed to better understand these upper expressions, but these data indicate that in the absence of the Pso2, Mre11 and Exo1 proteins, they may be replacing the exonuclease function, justifying the phenotype reversal presented by the double mutants (Figure 6 and 7). The type of lesion formed after treatment with cisplatin and other pathway repair proteins should also be evaluated for a better understanding of the results found.

.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Rio Grande do Sul Research Support Foundation (FAPERGS).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

Barber LJ, Ward TA, Hartley JA, McHugh PJ. 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.

Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. 2000. The Protein Data Bank. Nucleic Acids Res., **28**: 235–242.

Brendel M, Henriques JAP. 2001. The pso mutants of Saccharomyces cerevisiae comprise two groups: One deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res., **489**: 79–96.

Burke, D., Dawson, D., Stearns, T., & Cold Spring Harbor Laboratory. (2000). Methods in yeast genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory course manual. Plainview, N.Y: Cold Spring HarborLaboratory Press.

Cantero G, Pastor N, Mateos S, Campanella C, Cortés F. 2006. Cisplatin-induced endoreduplication in CHO cells: DNA damage and inhibition of topoisomerase II. Mutat Res., **599**(1-2):160-6.

Dronkert MLG, Kanaar R. 2001. Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat. Res. - DNA Repair*, **486**: 217–247

Flchtlnger-schepman AMJ, Van Dijk-knijnenburg HCM, Van Der Velde-visser SD, Berends F, Baan RA. 1995. Cisplatin- and carboplatin-DNA adducts: Is pt-ag the cytotoxic lesion? *Carcinogenesis*, **16**: 2447–2453.

Frankenberg-Schwager M, Kirchermeier D, Greif G, Baer K, Becker M, Frankenberg D. 2005. Cisplatin-mediated DNA double-strand breaks in replicating but not in quiescent cells of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Toxicology, **212**: 175–184.

Furuse M, Nagase Y, Tsubouchi H, Murakami-Murofushi K, Shibata T, Ohta K. 1998. Distinct roles of two separable in vitro activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination. EMBO J., **17**: 6412–6425.

Gietz RD, Schiestl RH. 2007. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nat. Protoc., **2**: 31–34.

Haddad R et al. 2003. Docetaxel, Cisplatin, 5-Fluorouracil (TPF)-Based Induction Chemotherapy for Head and Neck Cancer and the Case for Sequential, Combined-Modality Treatment. Oncologist, **8**: 35–44.

Henriques JAP, Brendel M. 1990. The role of PSO and SNM genes in DNA repair of the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Curr. Genet.*, **18**: 387–393.

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

Henriques JAP, Moustacchi E. 1981. Interactions between mutations for sensitivity to psoralenphotoaddition (pso) and to radiation (rad) in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol., **148**: 248–256.

Ho TV, Schärer OD. 2010. Translesion DNA synthesis polymerases in DNA interstrand crosslink repair. Environ. Mol. Mutagen.,**51**: 552–566.

Kim DE, Chivian D, Baker D. 2004. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. Nucleic Acids Res., **32**.

Krogh BO, Llorente B, Lam A, Symington LS. 2005. Mutations in Mre11 phosphoesterase motif I that impair Saccharomyces cerevisiae Mre11-Rad50-Xrs2 complex stability in addition to nuclease activity. Genetics, **171**: 1561–1570.

Lam, AF, Krogh, BO e Symington, LS (2008). Funções únicas e sobrepostas das nucleases Exo1, Mre11 e Pso2 no reparo de DNA. Reparo de DNA , 7 (4), 655-662. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.12.014.

Laskowski RA. 2001. PDBsum: Summaries and analyses of PDB structures. Nucleic Acids Res., **29**: 221–222.

Lesk AM. 2001. Introduction to Protein Architecture: the structural biology of proteins. Oxford University Press: New York.

Li X, Hejna J, Moses RE. 2005. The yeast Snm1 protein is a DNA 5′-exonuclease. DNA Repair (Amst).,**4**: 163–170.

Lippert B. 1992. From cisplatin to artificial nucleases - the role of metal ion-nucleic acid interactions in biology. *BioMetals*, **5**: 195–208.

Magana-Schwencke N, Pegas Henriques JA, 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.

Moreau S, Ferguson JR, Symington LS. 1999. The Nuclease Activity of Mre11 Is Required for Meiosis but Not for Mating Type Switching, End Joining, or Telomere Maintenance. Mol. Cell. Biol., **19**: 556–566.

Moura DJ, Castilhos B, Immich BF, Cañedo AD, Henriques JAP, Lenz G, Saffi J. 2010. Kin3 protein, a NIMA-related kinase of Saccharomyces cerevisiae, is involved in DNA adduct damage response. CellCycle, **9**: 2220–2229.

Munari FM et al. 2014. Sak1 kinase interacts with Pso2 nuclease in response to DNA damage induced by interstrand crosslink-inducing agents in Saccharomyces cerevisiae. J. Photochem. Photobiol. B Biol., **130**: 241–253.

Noll DM, McGregor Mason T, Miller PS. 2006. Formation and repair of interstrand crosslinks in DNA. *Chem. Rev.*, **106**: 277–301.

Pasadi S, Muniyappa K. 2020Evidence for functional and regulatory cross-talk between Wnt/β-catenin signalling and Mre11-Rad50-Nbs1 complex in the repair of cisplatin-induced DNA cross-links. Oncotarget., **11**(44):4028-4044.

Raymond WE, Kleckner N. 1993. RAD50 protein of S.cerevisiae exhibits ATP-dependent DNA binding. Nucleic Acids Res., **21**: 3851–3856.

Rogers CM, Lee CY, Parkins S, Buehler NJ, Wenzel S, Martínez-Márquez F, Takagi Y, Myong S, Bochman ML. 2020. The yeast Hrq1 helicase stimulates Pso2 translesion nuclease activity and thereby promotes DNA interstrand crosslink repair. J. Biol. Chem., **295**: 8945–8957.

Ruhland A, Haase E, Siede W, Brendel M. 1981. Isolation of yeast mutants sensitive to the bifunctional alkylating agent nitrogen mustard. MGG Mol. Gen. Genet., **181**: 346–351.

Syed A, Tainer JA. 2018. The MRE11-RAD50-NBS1 complex conducts the orchestration of damage signaling and outcomes to stress in DNA replication and repair. Annu Rev Biochem., **87**:263–294.

Tiefenbach T, Junop M. 2012. Pso2 (SNM1) is a DNA structure-specific endonuclease. Nucleic Acids Res., **40**: 2131–2139.

Trujillo KM, Roh DH, Chen L, Van Komen S, Tomkinson A, Sung P. 2003. Yeast xrs2 binds DNA and helps target rad50 and mre11 to DNA ends. J. Biol. Chem., **278**: 48957–48964.

Tsang RY, Al-Fayea T, Au HJ. 2009. Cisplatin overdose: Toxicities and management. *Drug Saf.*, **32**: 1109–1122.

Vasquez KM. 2010. Targeting and processing of site-specific DNA interstrand crosslinks. Environ. Mol. Mutagen., **51**: 527–539.

Wood RD. 2010. Mammalian nucleotide excision repair proteins and interstrand crosslink repair. Environ. Mol. Mutagen.,**51**: 520–526.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A construção da estrutura 3D da proteína Pso2 realizada neste trabalho é de suma importância para a progressão de estudos na área da Bioinformática, tendo em vista que este dado não foi registrado na literatura anteriormente. A estrutura tridimensional de uma proteína é responsável por determinar a sua função, sua capacidade de interação e seu papel em processos biológicos. Esta estrutura poderá ser utilizada no desenvolvimento de novos projetos com intuito de um melhor entendimento das funções da proteína Pso2 e seus interatores.

Outro objetivo deste trabalho foi elucidar a possível interação da proteína Pso2 com o complexo MRX e com a proteína Kin3, após tratamento com CIS, afim de propor um modelo de interação na reparação de lesão do tipo ICL no DNA. As curvas de sobrevivência realizadas neste trabalho com os duplos mutantes *kin3Δpso2Δ, rad50Δpso2Δ, xrs2Δpso2Δ* e *mre11Δpso2Δ* indicam a relação não-epistática entre estas proteínas. Todos os mutantes quando expostos à cisplatina por um período de 2 horas apresentaram uma elevada porcentagem de sobrevivência, superior ao simples mutante mais sensível, e superior também a linhagem selvagem BY4741. Buscando entender estes resultados, avaliamos a expressão gênica das exonucleases *MRE11, DNA2* e *EXO1* que poderiam estar atuando/sobrepondo a função dos genes deletados. Esta avaliação foi realizada somente nos mutantes *xrs2Δ*, *pso2Δ* e *xrs2Δpso2Δ* neste primeiro momento. As expressões apresentadas por *MRE11* e *EXO1* nos mutantes *pso2Δ* e *xrs2Δpso2Δ* sugerem que estas exonucleases podem ter um papel redudante no reparo das lesões induzidas por cisplatina nestas condições avalaidas.

Considerando a complexidade das lesões induzidas pela cisplatina associada as várias vias de reparo que podem ser acionadas para reparar essas lesões, é necessário avaliar a contribuição de outras vias de reparo neste contexto, o tipo de lesão que está sendo induzido nestas linhagens pela cisplatina, assim como o envolvimento de outras proteínas como toposiomerases e polimerases de síntese translesão.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, B.; SILVA, A.; MESQUITA, A.; SAMPAIO-MARQUES, B.; RODRIGUES, F.; LUDOVICO, P. **Drug-inducedapoptosis in yeast.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783: 1436–1448,2008.

BARBER, L. 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, Vol. 25, n. 6, p. 2297–2309, 15 mar. 2005.

BARR, M.M. **Super models.** *Physiological Genomics*, 13(1): 15-24, 2003.

BARTON, A. B.; DAVIES, C. J.; HUTCHISON III, C. A.; KABACK, D. B. **Cloning of chromosome *I* DNA from *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the FUN52 gene, whose product has homology to protein kinases.** Gene. Vol. 117, p. 137–140, 1992.

BELJANSKI, V.; MARZILLI, L.G.; DOETSCH, P.W. **DNA damage-processing pathways involved in the eukaryotic cellular response to anticancer DNA crooslinking drugs.** Mol. Pharmacology. Vol. 65, 1496-1506. 2004.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BATH, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. **The protein data bank.** Nucliec Acids Research, 8(1): 235–242, 2000.

BETHEA, D.; FULLMER, B.; SYED, G.; TIANO, J.; RISCHKO, C.; GILLESPIE, L.; BROWN, D.; GASPARRO, F.P. **Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine**. Dermatol Sri., 19(2):78-88, 1999.

BJELLAND, S.; SEEBERG, E. **Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation.** Mutat Res. 2003 Oct 29;531(1-2):37-80. 2003.

BOEIRA, J.M.; VIANA, A.F.; PICADA. J.N; HENRIQUES, J.A.P. **Genotoxic and recombinogenic activities of the li-carboline alkaloids harman and harmine in Saccharornyces cerevisiae**. Mutat. Res., v. 500. p. 39-48. 2002.

BOITEUX, S.; JINKS-RoOBERTSON, S. **DNA Repair Mechanisms and the Bypass of DNA Damage in *Saccharomyces cerevisiae*.** GENETICS, April 1, 2013 vol. 193 no. 4 1025-1064. 2013.

BOTSTEIN, D.; FINK, G.R. **Yeast: an experimental organism for 21st Century biology.** *Genetics*, 189(3): 695–704,2011.

BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing Yeast and Fermentation.** 1ª.ed., Blackwell Science Ltd., 643p., 2001.

BOYNTON, PJ; GREIG, D. **The ecology and evolution of non-domesticated *Saccharomyces species*.** *Yeast (Chichester, England), 31*(12), 449–462. 2014.

BRANZEI, D.; FOIANI, M.. **The checkpoint response to replication stress.** DNA Repair. Vol.8, Pages 1038-1046. 2009.

BRENDEL, M. HENRIQUES, J.A.P. **The pso mutants Saccharomyces cerevisiae comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen matabolism**. Mutat. Res., v. 489, p. 79-96, 2001.

BRENDEL, M.; BONATTO, D.; STRAUSS, M.; REVERS, L. F.; PUNGARTNIK, C.; SAFFI, J.; HENRIQUES, P. **Role of PSO genes in repair of DNA damage of *Saccharomyces cerevisiae*.** Mutat. Res. 544, 179–193. 2003.

CADET, J.; WAGNER, J. R**. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation.** Cold Spring Harbor perspectives in biology, 5(2), a012559. 2013.

CALDECOTT, K.W. **Single-strand break repair and genetic disease**. Nat Rev Genet. 2008 Aug;9(8):619-31. doi: 10.1038/nrg2380. 2008.

CANNAVO, E.; CEJKA, P. **Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks.** Nature. 2014 Oct 2;514(7520):122-5. 2017.

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.

CHEN, Y.; CHEN, P-L.; JIANG, X.; RILEY, DJ. **Never-in-mitosis related kinase 1 functions in DNA damage response and checkpoint control.** Cell Cycle, v. 7, n. 20, p. 3194–3201.2008.

CIMINO, GD; PAN, CX; HENDERSON, PT**. Personalized medicine for targeted, platinum-based chemotherapy of lung and bladder cancer**. Bioanalysis 5 , 369–391. 10.4155 / bio.12.325. 2013.

CLEAVER, J. E.; LAM, E. T.; REVET, I. **Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity.** Nat Rev Genet. 2009 Nov;10(11):756-68. doi: 10.1038/nrg2663. Epub 2009 Oct 7. PMID: 19809470.

COIN, F.; OKSENYCH, V.; EGLY, J. **Distinct Roles for the XPB/p52 and XPD/p44 Subcomplexes of TFIIH in Damaged DNA Opening during Nucleotide Excision Repair.** Molecular Cell, v. 26, n. 2, p. 245–256, 27 abr. 2007.

DE WIND, J.H; THEVELEIN, J.M. &, WINDERRICK, J. **Adaptation to nutrient depict ii in yeast. In: Hohmann, S., Mager, W. H.** Yeast Stress Responses. Springer, p.7- 2. NY, 1997.

DIZDAROUGLU, M. **Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer.** Mutat Res Rev. 2015 ;763:212-45. 2015.

DRONKERT, M.L; KANAAR, R. **Repair of interstrand cross-linim**. Mutat Rid 486(4):217-247, 2001.

DUDÁS, A.; CHOVANEC, M. **DNA double-strand break repair by homologous recombination**. Mutat. Res., v. 566, p. 131-167, 2004.

DUEVA, R.; ILIAKIS, G. **Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer.** Transl Cancer Res.2013;2(3):163-177. doi: 10.3978/j.issn.2218-676X.2013.05.02.

EICHMILLER, R.; MEDINA-RIVERA, M.; DESANTO, R.; MINCA, E.; KIM, C.; HOLLAND, C.; SEOL, J.; SCHMIT, M.; ORAMUS, D.; SMITH, J.; GALLARDO, I.F.; FINKELSTEIN, I.J.; LEE, S.E.; SURTEES, J.A. **Coordination of Rad1-Rad10 interactions with Msh2-Msh3, Saw1 and RPA is essential for functional 3′ non-homologous tail removal.** Nucleic Acids Research, v. 46, n. 10, p. 5075–5096, 2018.

EISEN, J.A.; HANAWALT, P.C. **A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes.** Mutat. Res., v. 435, p. 171-213, 1999.

FINN, K.; FRANCIS, N.; GRENON, L. M. **Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks.** *Cell Mol Life Sci* 69(9):1447-73. 2012.

FRANKENBERG-SCHWAGER, M.; KIRCHERMEIER, D.; GREIF, G.; BAER, K.; BECKER, M.; FRANKENBERG, D. **Cisplatin-mediated DNA double-strand breaks in replicating but not in quiescent cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae.*** Toxicology, 212: 175–184. 2005.

FRIEDBERG, E.C. **Eukaryotic DNA repair: Glimpses through the yeast *Saccharomyces cerevisiae.*** BioEssays. 1991.

FRIG BERG E.C.: WALKER, G.C. SIEDE, W. **DNA repair and mutagenesis**. Washington, DC: ASM Press, USA, 1995.

FRIEDBERG, E.C. **DNA damage and repair.** Nature. 23;421(6921):436-40. 2003.

FUGE, F K; WERNER-WASHBURNE, M. **Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae.* In: Hohmann S, Mager W II (eds) Yeast stress responses.** Springer, Berlin I leidelberg New York, p 53-74. 1997.

GAILLARD, H.; AGUILERA, A. **Transcription coupled repair at the interface between transcription elongation and mRNP biogenesis.** Biochim Biophys Acta. Jan;1829(1):141-50. 2013.

GALLONE, B.; STEENSELS, J.; PRAHL, T.; SORIAGA, L.; SAELS, V.; HERRERA-MALAVER, B.; MERLEVEDE, A.; RONCORONI, M.; VOORDECKERS, K.; MIRAGLIA, L.; TEILING, C.; STEFFY, B.; TAYLOR, M.; SCHWARTZ, A.;

RICHARDSON, T.; WHITE C.; BAELE, G.; MERE, S.; VERSTREPEN, K. J. **Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts.** *Cell*, *166*(6), 1397–1410.e16. 2016.

GAME, J.C. **The saccharomyces repair genes at the end of the century**. Mutat. Res., v. 451. p. 277-293, 2000.

GANCEDO, J.M. **Yeast carbon catabolite repression.** Microbiol Mol Biol Rev., 02(2)334-361, 1998.

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.; PHILIPPSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. **Life with 6000 Genes.** *Science*, 274: 546–567, 1996

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.** Mutat Res. Sep 15;461(1):1-13. 2000.

GROSSMANN, K.F.; WARD, A. M.; MATKOVIC, M.E.; FOLIAS, A.E.; MOSES, R.E. ***S. cerevisiae* has three pathways for DNA interstrand crosslink repair**. Mutation Research - DNA Repair, v. 487, n. 3–4, p. 73–83, 19 dez. 2001.

GUZDER, S. N.; SOMMERS, C. H.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. **Complex Formation with Damage Recognition Protein Rad14 Is Essential for *Saccharomyces cerevisiae* Rad1-Rad10 Nuclease To Perform Its Function in Nucleotide Excision Repair In Vivo.** Molecular and Cellular Biology, v. 26, n. 3, p. 1135–1141, 1 fev. 2006.

HADDAD, R.; TISHLER, R. B.; NORRIS, C. M.; MAHADEVAN, A.; M.; 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.** Oncologist, 8: 35–44. 2003.

HAYNES, R.H.; KUNZ, B.A. **The molecular biology of the yeast *saccharomyces*. Life cycle and inheritance by J N Strathern, E W Jones and J R Broach**. pp 751. Cold Spring Harbor publications.1981.

HENRIQUES, J. A. P.; MOUSTACCHI, E. **Interactions between mutations for sensitivity to psoralen photoaddition (pso) and to radiation (rad) in *Saccharomyces cerevisiae*.** Journal of Bacteriology, Vol. 148, n. 1, p. 248–256, 1981.

HENRIQUES, J.A.P.; BRENDEL, M. **The role of PSO and SNM genes in DNA repair of yeast Saccharomyces cerevisiae**. Curr. Genet., v. 18. p.387-393. 1990.

HENRIQUES, J. A. P.; BROZMANOVA, J.; BRENDEL, M. **Role of *PSO* genes in the repair of photoinduced interstrand cross-links and photooxidative damage in the**

DNA of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. JournalofPhotochemistryandPhotobiology B: Biology, 39(3): 185-196, 1997.

HERRERA-MOYANO, E.; MORIEL-CARRETERO, M.; MONTELONE, B.A.; AGUILERA, A. **The rem Mutations in the ATP-Binding Groove of the Rad3/XPD Helicase Lead to Xeroderma pigmentosum-Cockayne Syndrome-Like Phenotypes.** PLoS Genetics, v. 10, n. 12, 1 dez. 2014.

HIGO, T.; NAITO, A.; SUMIDA, T. **DNA single-strand break-induced DNA damage response causes heart failure.** Nat Commun 8, 15104. 2017.

HOCH, M.J. ; PATEL, S.H.; JETHANAMEST, D. **Head and neck MRI findings in CHARGE syndrome AJNR Am. J.** Neuroradiol., 38 (2357–63). 2017.

HOEIJMAKERS, J.H.J. **Nucleotide excision repair I: from E. coli to yeast**. Trends Genet, v. 9, p. 173-177, 1993a.

HOEIJMAKERS, J.H.J. **Nucleotide excision repair II: from yeast to mammals**. Trends Genet., v. 9, p. 211-217, 1993b.

HOEIJMAKERS, J. H. **DNA repair mechanisms.** Maturitas. Feb 28;38(1):17-22; discussion 22-3. 2001.

HUANG, H.; ZHU, L.; REID, B.R.; DROBNY, G.P.; HOPKINS, P.B. **Solution structure of a cisplatin-induced DNA interstrand cross-link.** Science. 270(5243):1842–1845. 1995.

JACKSON, S.P.; BARTEK, J. **The DNA-damage response in human biology and disease.** Nature. Oct 22;461(7267):1071-8. 2009.

JAROSLAV, K.; WEST, C. E.; WHITEC, C.; COSTA-NUNES, J. A.; KAREL, J. A. **Rapid repair of DNA double strand breaks in Arabidopsis thaliana is dependent on proteins involved in chromosome structure maintenance.** DNA Repair (8), 413-419. 2009.

JONES, D. G. L.; ROSAMOND, J. **Isolation of a novel protein kinase-encoding gene from yeast by oligodeoxyribonucleotide probing.** Genes, v. 90, n. 1, p. 87–92, 1990.

KARATHIA, H.; VILAPRINYO, E.; SORRIBAS, A.; ALVES, R. ***Saccharomyces cerevisiae* as a modelorganism: a comparativestudy.** *PloSOne,* 6(2): e16015. 2011.

KOWALTOWSKI, A.J.; PINTO, N.C.S.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. **Mitochondria and reactive oxygen species.** Free Radical Biology and Medicine, Volume 47, Issue 4, Pages 333-343. 2009.

KUPIEC, M. **Damage induced recombination in the yeast Saccharomyces cerevisiae**. Mutat. Res., v. 451, p. 91-105. 2000.

KURTZ, J.E.; DUFOUR, P.; DUCLOS, B.; BERGERAT, J.P.; EXINGER, F. ***Saccharomyces cerevisiae*: an efficient tool and model system for anticancer research.** *Bulletin-duCancer*. 91: 133–139,2004.

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, v. 7, n. 4, p. 655–62, 2 abr. 2008.

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.

LEHMANN, A.R.; FUCHS, R.P. **Gaps and forks in DNA replication: Rediscovering old models.** DNA Repair (Amst). Dec 9;5(12):1495-8. 2006.

LESK, A.M. **Introduction to Protein Architecture: the structural biology of proteins.** Oxford University Press: New York. 2001.

LI, W.; LI, S. **Facilitators and Repressors of Transcription-coupled DNA Repair in *Saccharomyces cerevisiae*.** Photochemistry and Photobiology, v. 93, n. 1, p. 259–267, 2017.

LI, X.; MOSES, R. E. **The β-lactamase motif in Snm1 is required for repair of DNA double-strand breaks caused by interstrand crosslinks in *Saccharomyces cerevisiae*.** DNA Repair, v. 2, n. 1, p. 121–129, 2 jan. 2003.

LI, X.; HEJNA, J.; MOSES, R. E. The **yeast Snm1 protein is a DNA 5′-exonuclease.** DNA Repair, v. 4, n. 2, p. 163–170, 3 fev. 2005.

LIEBER, M.R. **The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway.** Annu Rev Biochem. 79:181-211. 2010.

LIPPERT, B. **Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug.** Weinheim New York Wiley-VCH Zürich Verlag Helvetica Chimica Acta. 1999.

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

LITI, G; Carter, D.M.; MOSES, A. M.; WARRINGER, J.; PARTS, L., JAMES, S. A.; DAVEY, R. P.; ROBERTS, I. N.; BURT, A.; KOUFOPANOU, V.; TSAI, I. J.; BERGMAN, C. M.; BENSASSON, D.; O'KELLY, M. J.; OUDENAARDEN, A.; BARTON, D. B.; BAILES, E.; NGUYEN, A. N.; JONES, M.; QUAIL, M. A; LOUIS, E.J. **Population genomics of domestic and wild yeasts.** Nature, *458*(7236), 337–341. 2009.

LUSCOMBE, N. M.; GREENBAUM, D., GERSTEIN, M. **What is Bioinformatics? A Proposed Definition and Overview of the Field.** Methods of Information in Medicine, 40(4): 346–358, 2001.

MACÉ-AIMÉ, G.; COUVÉ, S.; KHASSENOV, B.; ROSSELLI, F.; SAPARBAEV, M. K. **The Fanconi anemia pathway promotes DNA glycosylase-dependent excision of interstrand DNA cross-links.** Environ Mol Mutagen 51:508-519. 2010.

MELO, A. A.: QUEROL, C. B.: HENRIQUES, A.T.; HENRIQUES, J.A.P. **Cytostatic, cytotoxic and mutagenic effects of vincristine and índole alkaloid in wild-type and repair-deficient yeasts**. Mutat. Res.. v. 171, p. 17-24, 1986.

MILES, G.M.; SANCAR, A. **DNA repair.** Chem Res Toxicol 2:197-226. 1989.

MILLER, R. D.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. **Genetic control of excision of *Saccharomyces cerevisiae* interstrand DNA cross-links induced by psoralen plus near-UV light.** Molecular and Cellular Biology, v. 2, n. 8, p. 939–948, ago. 1982.

MISTELI, T.; SOUTOGLU, E. **The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance.** *Nature Reviews Molecular CellBiology*, 10: 243-254, 2009.

MOREAU, S.; MORGAN, E. A.; SYMINGTON, L. S. **Overlapping functions of the Saccharomyces cerevisiae Mre11, Exo1 and Rad27 nucleases in DNA metabolism.** Genetics, v. 159, n. 4, p. 1423–1433, 2001.

MORENO, P.R.H.; VARGAS, V.M.F.; ANDRADE, H.H.R.; HENRIQUES, A.T.; HENRIQUES, J.A.P. **Genotoxicity of the boldine aporphine alkaloid in prokaryotic and eukaryotic organisms**. Mutat. Res., v. 260, p. 145-152, 1991.

MORREALL, J.F.; PETROVA, L.; DOETSCH, P.W. **Transcriptional mutagenesis and its potential roles in the etiology of cancer and bacterial antibiotic resistance.** J Cell Physiol. Dec;228(12):2257-61. 2013.

MORRIS, NR. **Mitotic mutants of *Aspergillus nidulans*.** Genet Res. Dec;26(3):237-54. 1975.

MOURA, D. J.; CASTILHOS, B.; IMMICH, B. F.; CAÑEDO, A.; HENRIQUES, J. P.; LENZ, G.. **Kin3 protein, a NIMA-related kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, is involved in DNA adduct damage response**. Cell Cycle. Pages 2220-2229 | 01 Jun 2010.

MOURET, S.; BAUDOUIN, C.; CHARVERON, M.; FAVIER, A.; CADET, J,.; douki, T. **Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation.** Proc Natl Acad Sci USA. Sep 12;103(37):13765-70. 2006.

MOUSTACCHI, E.; FAVAUDON, V.; BISAGNI, E. **Likehood of the new antitumoral drug 1017-diethylaminopropylamino]-6methy1-5H- pyrido[3",4":4,5]pyrrolo[2,3-g] isoquinoline (BD-40), a pyridopyrroloisoquinoline derivate, to induced DNA strand breaks in vivo and its nonmutagenicity in yeast**. Cancer Res., v. 43, p. 3700-3706. 1983.

MURPHY, M.P. **How mitochondria produce reactive oxygen species.** *Biochem J*; 417 (1): 1–13. 2009.

NASSOUR, A.; MAUCHAMP, V.; YU, W. ; CABIOCH, T.; PIRAUX, L.; GAUTHIER-BRUNET, V.; DUBOIS, S. Key **role of electron-phonon interactions in the electronic conductivity of Ti3SiC2: Experiment *and ab initio* calculations.** PHYSICAL REVIEW B 93, 085119. 2016.

NICKOLOFF, J.A.; HOEKSTRA, M.F. **DNA Damage and Repair**. Totowa, New a Jersey: Human Press, 1998.

NOLL, D.M.; MASON, T.M. & MILLER, P.S. **Formation and repair of interstrand cross-links in DNA**. Chem Rev., 106(2):277-30I, 2006.

OAKLEY, B. R.; MORRIS, N. R. **A mutation in *Aspergillus nidulans* that blocks the transition from interphase to prophase.** Journal of Cell Biology, v. 96, n. 4, p. 1155–1158, 1983.

O'CONNELL, M. J.; KRIEN, M. J. E.; HUNTER, T. **Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control.** Trends in Cell Biology, v. 13, n. 5, p. 221–228. 2003.

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

PASADI, S.; MUNIYAPPA, K. **Evidence for functional and regulatory cross-talk between Wnt/β-catenin signalling and Mre11-Rad50-Nbs1 complex in the repair of cisplatin-induced DNA cross-links**. Oncotarget, 11(44): 4028-4044, 2020.

PASQUAL, M.S.; LAUER, C.P.; MOYNA, P.; HENRIQUES, J.A.P. **Genotoxicity of the isoquinoline alkaloid berberine in prokariotic and eukariotic organisms**. Mutat. Res., v. 286, p. 243-252, 1993.

PASSARGE, E. **Genética: texto e atlas.** 2ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 456 p., 2004.

PAULA-RAMOS, A.L.L.; QUEROL, C.B.; MARQUES, E.K.; HENRIQUES, J.A.P. **Cytotoxic activation of the pyrrolizidine alkaloid integerrimine in the yeast Saccharomyces cerevisiae is caused by repairable DNA damage**. Rev. Bras. Genet., v.14, p. 897-912, 1991.

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.

PETER, J.; DE CHIARA, M.; FRIEDRICH, A.; YUE, J. X.; PFLIEGER, D.; BERGSTRÖM, A.; SIGWALT, A.; BARRE, B.; FREEL, K.; LLORED, A.; CRUALD, C.; LABADIE, K.; AURY, J. M.; ISTACE, B.; LEBRIGAND, K.; BARBRY, P.;

EEGELEN, S.; LEMAINQUE, A.; WINCKER, P.; LITI, G.; SCHACHERER, J. **Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates.** *Nature*, *556*(7701), 339–344. 2018.

POLI, P.; BUSCHINI, A.; CANDI. A.; ROSSI, C. **Bleomycin genotoxicity alteration by glutathione and cytochrome P-450 cellular content in respiratory proficient and deficient strains of Saccharomyces cerevisiae**. Mutagenesis. v. 14. p. 233-238. 1999.

POVIRK, L. F.; SHUKER, D. E. **DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards.** Mutat Res. Dec;318(3):205-26. 1994.

PRAKASH, S.; PRAKASH, L. **Nucleotide Excision Repair in Yeast.** Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. Vol. 451, 1-2. 2000.

PRETORIUS, I. **Tailoring wine yeast for the new Millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking.** Yeast, Vol. 16, p. 675-729, 2000.

PRINGLE, J.R.; BROACH, J.R. & JONES, E.W. **The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** Vol 3. Cell Cycle and Cell Biology. Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1997.

RESNICK, M.A.; COX, B.S. **Yeast as an honorary mammal**. *MutationResearch*, 451(1-2): 1–11,2000.

ROGERS, C. M.; LEE, C.Y.; PARKINS, S.; BUEHLER, N.J.; WENZEL, S.; MARTINEZ-MARQUEZ, F.; TAKAGI, Y.; MYONG, S.; BOCHMAN, M.L . **The yeast Hrq1 helicase stimulates Pso2 translesion nuclease activity and thereby promotes DNA interstrand crosslink repair.** The Journal of biological chemistry, v. 295, n. 27, p. 8945–8957, 3 jul. 2020.

ROSA, R.M.; SULZBACHER, K.; PICADA, J.N.; ROESLER, R.; SAFFI, J.; BRENDEL. M.: HENRIQUES. J.A.P. **Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast. Mutat**. Res., v. 563, p. 107-115. 2004.

SARKAR, S.; DAVIES, A.A.; ULRICH, H.D.; MCHUGH, P.J. **DNA interstrand cross-link repair during G1 involves nucleotide excision repair and DNA polymerase ζ.** The EMBO Journal, v. 25, n. 6, p. 1285–1294, 22 mar. 2006.

SCHÄRER, O.D. **DNA interstrand crosslinks: natural and drug-induced DNA adducts that induce unique cellular responses.** *ChemBioChem*, 6(1): 27–32. 2005.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N.S. **ROS function in redox signaling and oxidative stress.** Curr Biol.19;24(10):R453-62. 2014.

SELVAM, K.; DING, B.; SHARMA, R.; LI, S. **Evidence that Moderate Eviction of Spt5 and Promotion of Error-Free Transcriptional Bypass by Rad26 Facilitates Transcription Coupled Nucleotide Excision Repair.** Journal of Molecular Biology, v. 431, n. 7, p. 1322–1338, 29 mar. 2019.

SCHULTZ, S. J.; NIGG, E. A. **Identification of 21 Novel Human Protein Kinases, Including 3 Members of a Family Related to the Cell Cycle Regulator nimA of *Aspergillus nidulans*.** Cell Growth & Differentiation, Vol. 4, n. October, p. 821–830, 1993.

SHEN, X.; LI, L. **Mutagenic repair of DNA interstrand crosslinks**. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51: 493–499,2010.

SPIVAK, G. **Nucleotide excision repair in humans.** DNA Repair (Amst). Dec;36:13-18. 2015.
SPIVAK, G. **Transcription-coupled Repair: an Update**. Archives of Toxicology, v. 90, n. 11, p. 2583–2594, 22 nov. 2016.

SWANSON, R. L.; MOREY, N.J.; DOETSGH, P.W.; JINKS-ROBERTSON, S. **Overlapping specificities of base excision repair, nucleotide excision repair, recombination, and translesion synthesis pathways for DNA base damage in Saccharotnyces cerevisiae**. Mol. Cell. Biol., v. 19, p. 2929-2935, 1999.

TIEFENBACH, T.; JUNOP, M. **Pso2 (SNM1) is a DNA structure-specific endonuclease.** Nucleic Acids Research, v. 40, n. 5, p. 2131–2139, mar. 2012.

TSANG, R.Y.; AL-FAYEA, T.; AU, H. J. **Cisplatin overdose: Toxicities and management.** *Drug Saf.*, 32: 1109–1122. 2009.

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 BiologyoftheCell*, 16(2): 597–608,2005.

VASQUEZ, K. M. **Targeting and processing of site-specific DNA interstrand crosslinks.** Environ. Mol. Mutagen., 51: 527–539. 2010.

WINZELER, E.A.: DAVIS. R.W. **Functional analyses of the yeast genome.** Curr. Opin. Genet., v. 7, p. 771-776, 1997.

WINZELER,EA; SHOEMAKER, D.D.; ASTROMOFF, A.; LIANG, H.; ANDERSON, K.; ANDRE, B.; BANGHAM, R.; BENITO, R.; BOEKE, J.D.; BUSSEY, H.; CHU, A.M.; CONNELLY, C.; DAVIS, K.; DIETRICH, F.; DOW, S.W.; EL BAKKOURY, M.; FOURY, F.; FRIEND, S.H.; GENTALEN, E.; GIAEVER, G.; HEGEMANN, J.H.; JONES, T.; LAUB, M.; LIAO, H.; DAVIS, R.W. **Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis.** Science, v. 285, p. 901-906, 1999.

WOOD, R. D. ***Mammalian* nucleotide excision repair proteins and interstrand crosslink repair.** Environ. Mol. Mutagen.,51: 520–526. 2010.

YAN, S.; SORRELL, M.; BERMAN, Z. **Functional interplay between ATM/ATR-mediated DNA damage response and DNA repair pathways in oxidative stress.** Cell Mol Life Sci. Oct;71(20):3951-67. 2014.

CURRÍCULO LATTES

Thais Raupp Azevedo

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/6944475636178855

Última atualização do currículo em 29/12/2020

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (2015). É mestranda no Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Atualmente, atua como Pesquisadora no Hospital Moinhos de Vento. **(Texto informado pelo autor)**

Formação acadêmica/titulação

2017 Mestrado em BIOCIÊNCIAS. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil.

Título: Papel da proteína Pso2 na resposta a danos no DNA do tipo ICL em *Saccharomyces cerevisiae.* Orientador: Dinara Jaqueline Moura Co-orientador: João Antonio Pegas Henriques.

2011 - 2015 Graduação em Ciências Biológicas. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil.

2005 - 2007 Ensino Profissional de nível técnico em Técnico em enfermagem. Escola Técnica Cristo Redentor, ETCR, Brasil .

2000 - 2002 Ensino Médio (2o grau). Escola Estadual de 1° e 2° graus Gomes Carneiro, Brasil, Ano de obtenção: 2002.

Formação complementar

2016 Inglês.

MINDS ENGLISH SCHOOL, MES, Brasil.

Atuação profissional

1. Hospital Moinhos de Vento - HMV

2020 - Atual Vínculo: Colaborador

Enquadramento funcional: Pesquisadora, Carga horária: 40, Regime: Integral Outras informações: Atuando no laboratório de Biologia Molecular - COVID-19.

2018 - 2020 Vínculo: Colaborador

Enquadramento funcional: Analista de atendimento, Carga horária: 40, Regime: Integral.

2009 - 2018 Vínculo: Colaborador

Enquadramento funcional: Técnica em enfermagem, Carga horária: 36, Regime: Parcial.

2. Laboratório Marques Pereira - LMP

2015 - 2015 Vínculo: Estágio

Enquadramento funcional: Estágio curricular , Carga horária: 20, Regime: Parcial.

3. Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul - FZB/RS

2014 - 2014 Vínculo: Estágio

Enquadramento funcional: Estágio curricular , Carga horária: 20, Regime: Parcial.

4. Laboratório Weinmann - WMN

2007 - 2011 Vínculo: Colaborador

Enquadramento funcional: Assistente de coleta , Carga horária: 36, Regime: Parcial.

5. Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

2009 - 2009 Vínculo: Colaborador

Enquadramento funcional: Técnico em enfermagem , Carga horária: 36, Regime: Parcial.

Idiomas

Inglês: Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Razoavelmente.
Espanhol: Compreende Pouco, Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Pouco
Português: Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Eventos

Participação em eventos:

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) III Encontro do PPGBIO & Encontro de Pesquisa em Biologia Celular, 2018. (Encontro).
Papel da proteína Pso2 na resposta a danos no DNA do tipo ICL em *Saccharomyces cerevisiae*.
2. IV Simpósio Internacional de Enfermagem do Hospital Moinhos de Vento, 2018. (Simpósio).
3. 18º Congresso Internacional da Gestão, 2017. (Congresso).
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) II Encontro do PPG Biociências e Encontro de Pesquisa em Fisiologia do RS, 2017. (Encontro).
Papel da proteína pso2 na resposta a danos no DNA do tipo ICL em *Saccharomyces cerevisiae.*
5. VI Simpósio Internacional de Estresse Oxidativo e Doenças Cardiovasculares, 2017. (Simpósio).
6. 4° Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde - 15h - ULBRA, 2015. (Simpósio).
7. Workshop de Microbiologia dos Alimentos, 2015. (Outra).
8. Curso de Ciências Médicas Forense, 2013. (Outra).
9. Curso de extensão em introdução a Biologia Forense, 2012. (Outra).