



**INSTITUTO  
FEDERAL**  
Rio de Janeiro

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

**Campus Rio de Janeiro**

**Curso de Ciências Biológicas-  
Habilitação em Biotecnologia**

**Stefany Cristine  
Rodrigues da Silva**

**Validação Funcional dos  
Sítios de Fosforilação  
Regulados pela Via de  
Resposta ao dano no DNA  
em condição de estresse de  
replicação**

**Rio de Janeiro  
2018**

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO  
RIO DE JANEIRO

STEFANY CRISTINE RODRIGUES DA SILVA

**VALIDAÇÃO FUNCIONAL DOS SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO  
REGULADOS PELA VIA DE RESPOSTA AO DANO NO DNA EM  
CONDIÇÃO DE ESTRESSE DE REPLICAÇÃO**

RIO DE JANEIRO

2018

**STEFANY CRISTINE RODRIGUES DA SILVA**

**VALIDAÇÃO FUNCIONAL DOS SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO  
REGULADOS PELA VIA DE RESPOSTA AO DANO NO DNA EM  
CONDIÇÃO DE ESTRESSE DE REPLICAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial a obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas com habilitação em biotecnologia pelo Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro.

Orientador Científico: Drº Francisco Meirelles Bastos de Oliveira

**RIO DE JANEIRO**

**2018**

Ficha catalográfica elaborada por  
Sergio Pinheiro Rodrigues  
CRB7 3684



S586

Silva, Stefany Cristine Rodrigues da.

Validação funcional dos sítios de fosforilação regulados pela via de resposta ao dano no DNA em condição de estresse de replicação. / Stefany Cristine Rodrigues da Silva. – Rio de Janeiro, 2018.

57 f.: il.; 21 cm.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas com habilitação em Biotecnologia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, 2018.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Meirelles Bastos de Oliveira

1. DNA-Resposta ao dano. 2. Fosforilação. I. Oliveira, Francisco Meirelles Bastos de. II. Título.

IFRJ/CMAR/CoBib

CDU 601.4:577.214



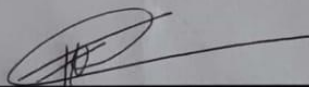
**STEFANY CRISTINE RODRIGUES DA SILVA**

**VALIDAÇÃO FUNCIONAL DOS SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO  
REGULADOS PELA VIA DE RESPOSTA AO DANO NO DNA EM  
CONDIÇÃO DE ESTRESSE DE REPLICAÇÃO**

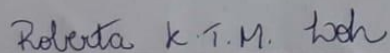
Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito parcial a  
obtenção do grau de bacharel em  
Ciências Biológicas com habilitação em  
biotecnologia pelo Instituto Federal de  
Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro.

Orientador: Francisco Meirelles Bastos de  
Oliveira

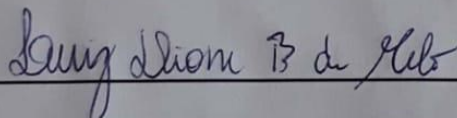
**APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA EM DEZEMBRO DE 2018**



Prof. Dr. Francisco Meirelles Bastos de Oliveira – Orientador Científico (IBCCF/UFRJ)



Profª. Drª Roberta Kuan Tchien de Mello Loh – Orientadora Acadêmica (IFRJ)



Prof. Dr. Luiz Dione Barbosa de Melo - Examinador (IFRJ)

**Dedico este trabalho a minha mãe Ana Lúcia e o meu pai Salomão Sabino (em memória) que tanto me apoiaram durante esta linda caminhada que trilhamos juntos.**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, que está me ajudando e segurando na minha mão desde sempre, seja de forma direta ou indiretamente através das pessoas que estão na minha vida.

Aos meus pais, só tenho a agradecer pela educação, carinho, atenção e até pelos puxões de orelhas, tudo que eu sou hoje e que eu serei um dia, é fruto da semente que vocês plantam em mim todos os dias, agradeço imensamente por acreditarem nos meus sonhos, eu sempre achei que era muito diferente de vocês e hoje me pego pensando que há mais de vocês em mim do que um dia eu imaginaria. Agradeço também pelo presente de ter uma irmã como a Stella, ela nem sabe, mas em inúmeras vezes as bobearas dela fizeram o meu dia um pouco melhor ou aliviaram a tensão das cobranças. É muito bom ter um irmão/filha.

Agradeço aos mestres, desde o ensino médio até a graduação, obrigada pelas dicas, pelos conselhos, pelos ensinamentos, pela paciência com as minhas milhares de perguntas, me sinto completamente agraciada por estar me formando com 50% do conhecimento oriundo da UEZO e 50% do IFRJ.

Agradeço ao meu orientador prof. Francisco Bastos de Oliveira por ter confiado em mim em 2015 quando eu fui toda cheio de medo para a entrevista, por ter acreditado no meu potencial mesmo com os meus erros de principiante, te considero meu pai na ciência, agradeço todo o carinho e atenção, por todos os conselhos sobre a ciência, por praticamente pegar minha mão até eu aprender a fazer os experimentos como tinha que ser, por estar me aturando a 3 anos e estar disposto a me aturar por mais 2, só tenho a agradecer.

Agradeço aos amigos de laboratório, a minha primeira parceira de laboratório, Michellin que estava comigo vivendo o momento da descoberta de uma profissão, das risadas na sala de cultura, das vezes que só nos abraçamos porque alguma coisa tinha dado errado e das vezes que tomamos bronca juntas, obrigada pelos dois anos de convivência. Depois eu ganhei de presente uma doutoranda que virou minha amiga da vida, que aprendeu a reconhecer os meus olhares tristes, os dias que eu estava à beira de colapso, Barbara sou extremamente agradecida por você ter se tornado uma amiga além de minha parceira de laboratório, obrigada por todas as conversas e conselhos, pelos abraços, obrigada! Essa vitória é sua também.

Agradeço por ter feito Iniciação Científica no Fundão, porque eu aprendi o espírito de comunidade e com isso fiz ótimos amigos. Obrigada a galera do LIRS, do LabGenest (principalmente ao Pedro, Jana, Júnior, que me ouviram pedir as coisas mais de 200x), do Laboratório do Prof. Fantappié que vibraram com as minhas vitórias dos primeiros géis e me deram conselhos quando o resultado não era bom, ao laboratório do Prof. Claudio Masuda que já não me aguentavam mais pedindo o replicador emprestado, mas sempre me receberam com um sorriso no rosto. Obrigada aos antigos integrantes do LIRS (Carolina Calôba, Prof.<sup>a</sup> Miriam, Prof. André, Lucas Tostes), seremos sempre do mesmo laboratório.

Agradeço aos amigos que dessas duas faculdades me deu a UEZO e ao IFRJ, ao meu amigo desde UEZO Gabriel Stocco, valeu pelas parcerias eternas, pelos amigos do UFRJ – IFRJ, principalmente ao Philippe Caloba que além de companhia nesse trajeto diário, sempre me ofereceu seu ombro amigo e ajuda com as matérias, pelos amigos do expresso Belford, pelos amigos da Recombina, pelos amigos das diversas turmas diferentes que fiz matéria, pelos abraços nos corredores, pelas risadas no CA e até pelos choros que por vezes não segurei e que

sempre tinha um colo pra me receber. Tornei-me mobília do CAMHAM, mesmo sendo a pessoa que conseguiu ficar menos tempo no IFRJ ,valeu pessoal, obrigada por tudo. E um agradecimento especial ao Heber Lopes, que teve toda a paciência do mundo em me ajudar em muitos momentos que me desesperiei por conta do TCC, ano que vem é a sua vez e já estou me preparando para o corujão te ajudando nas correções.

Também não poderia deixar de agradecer ao melhor quarteto que a baixada conhece (porque não nego as raízes), Bia, Carol e Flavinha, obrigada por aturarem todas as minhas crises existências, obrigada pelas risadas que compartilhamos e pelos choros também, todos foram de suma importância.

E um agradecimento a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para que esse trabalho fosse concluído, muito obrigada.



**“Estou entre aqueles que pensam que  
a ciência tem uma grande beleza.”  
(Marie Curie)**

## RESUMO

A via de resposta ao dano de DNA (RDD) é importante no monitoramento de estruturas aberrantes de DNA. Em células humanas, a via de RDD é regulada pelas quinases ATM, ATR, Chk1 e Chk2. Em *Saccharomyces cerevisiae*, essas quinases correspondem respectivamente a Tel1, Mec1 e Rad53. Utilizando uma abordagem fosfoproteômica quantitativa, identificamos 180 proteínas contendo 235 resíduos fosforilados *in vivo* pelas quinases Mec1, Tel1 e/ou Rad53. Entretanto, a relevância biológica de grande parte dessas fosforilações permanece desconhecida. Para avaliar a relevância dos sítios de fosforilação, mutantes nocaute para as 180 proteínas identificadas como alvo de Mec1/ Tel1 e/ou Rad53 foram submetidos a um ensaio de sensibilidade utilizando drogas que induzem o estresse de replicação, revelando a presença de 62 mutantes com sensibilidade a uma ou mais drogas. Em uma segunda etapa, os mutantes que apresentaram sensibilidade foram testados individualmente para validação dos resultados obtidos na primeira etapa. Dentre 180 proteínas não essenciais fosforiladas *in vivo* pelas quinases Mec1, Tel1 ou Rad53, pelo menos 48 delas foram categorizadas como relevantes para a tolerância da célula ao estresse de replicação. Dentre esses 48 mutantes, *vps72Δ* apresentou uma alta sensibilidade ao tratamento com metanossulfonato de metila. A proteína Vps72 apresenta uma fosforilação dependente de Tel1/Mec1 na serina 425 além de outros 8 potenciais sítios de fosforilação nas posições T94, S102, T237, S479, T579, T627, T694 e S784. Utilizando uma técnica para indução de mutação sítio dirigida, os 9 sítios de fosforilação foram mutados gerando o fosfomutante *vps72-9A*, entretanto, esse fosfomutante não foi capaz de recapitular a sensibilidade observada no mutante nocaute *vps72Δ*. Esse resultado sugere que a função de Vps72 na tolerância ao estresse de replicação não depende da fosforilação dos sítios T94, S102, T237, S425, S479, T579, T627, T694 e S784.

**Palavras-Chave:** Sinalização da Resposta ao Dano de DNA; Estresse de replicação; Fosforilação; *Saccharomyces cerevisiae*.

## ABSTRACT

The DNA damage response pathway (DDR) is important in monitoring DNA aberrant structures. In human cells, a DDR is regulated by ATM, ATR, Chk1 and Chk2 kinases. In *Saccharomyces cerevisiae*, those kinases directly corresponding to Tel1, Mec1 and Rad53. A quantitative phosphoproteomics measure was used to identify 180 proteins containing 235 phosphorylated sites *in vivo* by Mec1, Tel1 and/or Rad53 kinases. However the biological relevance of major part this phosphorylation remains unknown. To evaluate the relevance of the phosphorylation sites, knockout mutants for the 180 proteins identified of Mec1, Tel1 and/or Rad53 targets underwent a sensibility assay using drugs that induce replication stress, revealing the presence of 62 mutants with sensibility to one or more drugs. In a second step, the mutants that showed sensibility were individually tested for validation of the results obtained in the first step. Of the 180 non-essential phosphorylated proteins *in vivo* by Mec1, Tel1 or Rad53 kinases, at least 48 of them are relevant for cell tolerance to replication stress. Among these 48 mutants, *vps72Δ* showed a high sensibility to methyl methanesulfonate treatment. The Vps72 protein exhibits Tel1 / Mec1-dependent phosphorylation at serine 425 plus another 8 potential phosphorylation sites at positions T94, S102, T237, S479, T579, T627, T694 and S784. Using a technique for site-directed mutation induction, the 9 phosphorylation sites were mutated generating the phosphomutant *vps72-9A*, however, this was not able to recapitulate the sensibility observed in the *vps72Δ* knockout mutant. This result suggests that the Vps72 function in replication stress tolerance does not depend on the phosphorylation of the T94, S102, T237, S425, S479, T579, T627, T694 and S784 sites.

**Keywords:** Signaling of DNA Damage Response; Replication stress; Phosphorylation; *Saccharomyces cerevisiae*.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Ciclo celular.....	1
1.2 Estresse de replicação.....	1
1.3 Instabilidade genômica.....	2
1.4 Via de resposta ao dano no DNA.....	3
1.5 Ortólogos de ATM/ATR e CHK1/CHK2 em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	4
1.6 Relevância do organismo modelo.....	5
1.7 Identificação dos alvos de MEC1/TEL1 e/ou RAD53.....	6
2. JUSTIFICATIVA.....	7
3. OBJETIVO.....	7
4. MATERIAL E METÓDOS.....	8
4.1 Linhagens de leveduras e biblioteca de mutantes nocaute.....	8
4.2 Condições de crescimento.....	8
4.3 Meios sólidos.....	8
4.4 Varredura genética.....	9
4.4.3 Varredura genética secundária.....	10
4.5 Produção dos mutantes.....	11
4.5.1 Critérios para seleção dos fosfomutantes.....	11
4.5.2 Confirmação genotípica dos mutantes Vps72.....	11
4.5.3 Transformação em levedura.....	12
4.5.4 Extração de DNA.....	13
4.5.5 Confirmação do mutante Vps72.....	14
4.6 Produção dos fosfomutantes.....	14
4.6.1 Clonagem.....	14
4.6.2 Transformação em bactérias competentes e extração de plasmídeo.....	16
4.6.3 Mutação sitio dirigida.....	16
4.6.4 Integração genômica dos fosfomutantes.....	18
5. RESULTADOS.....	19
5.1 Varredura primária.....	19
5.2 Varredura secundária.....	22
5.3 VPS72.....	28
6. DISCUSSÃO.....	31

6.1	Análise dos mutantes sensíveis .....	31
6.2	VPS72 .....	34
7.	CONCLUSÃO .....	37
8.	REREFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
	Anexo A.....	42

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Ciclo celular

O ciclo celular tem como principal objetivo a duplicação fiel de todo material genético para a posterior segregação dos cromossomos entre as células filhas, este evento ocorre tanto para a geração de novos indivíduos, como no caso de organismos unicelulares, como para o crescimento de organismos multicelulares.

O ciclo celular pode ser dividido em quatro fases: Fase G1, S, G2 e M. As fases mais importantes da divisão celular são as fases S (Síntese do DNA) e a fase M (Mitose), fases onde ocorre a duplicação e segregação do material genético. As fases G1 e G2 são fases preparatórias sendo essenciais para o crescimento celular adequado que antecede a replicação e a mitose. Durante as fases G1 e G2 a célula monitora as condições externas, como falta de nutrientes, fatores de crescimento e internas, como duplicação de organelas e síntese de proteínas. Essas fases são fundamentais a fim de assegurar que todas as condições estejam adequadas para a duplicação do DNA durante a fase S e para que o DNA seja posteriormente dividido de maneira igualitária entre as células- filha durante a fase M (ALBERTS, JOHNSON, LEWIS, RAFF, ROBERTS, 2007).

### 1.2 Estresse de replicação

Durante a fase S do ciclo celular, a célula está empenhada na replicação do material genético livre de erros. Para isso, a forquilha de replicação precisa disparar diferentes origens de replicação e ainda dispor de forquilhas bidirecionais. Considerando o tamanho do genoma nos organismos eucariotos, o disparo bidirecional de forquilhas de replicação através de diferentes origens de replicação é fundamental para que a célula consiga replicar todo o material genético em tempo hábil, impedindo assim que o ciclo celular se prolongue demais (MASAI et al., 2010).

Um dos desafios para a célula durante a replicação do DNA é a presença de inúmeras barreiras que se opõem a progressão da forquilha. O acúmulo desses obstáculos pode gerar o que caracterizamos de estresse de replicação (ZEMAN; CIMPRICH, 2014). Halazonetis e colaboradores (2008) (HALAZONETIS;

GORGOULIS; BARTEK, 2008) definiram o estresse de replicação como uma condição sistêmica que leva a parada da forquilha de replicação e consequente inabilidade da célula em dar continuidade a replicação do DNA.

As barreiras que se opõem a forquilha são, na maioria das vezes, consequências de adutos de DNA gerados pela ligação covalente de agentes químicos, pela associação de complexos transcricionais em regiões de intensa transcrição gênica e ainda por estruturas secundárias que podem ser assumidas pela molécula de DNA. O estresse de replicação pode ser causado também por uma diminuição nas concentrações de dNTPs na célula. A diminuição nas concentrações de dNTPs que pode levar a uma diminuição na processividade das polimerases e a uma consequente parada na progressão da forquilha. Em condições fisiológicas, as barreiras que se opõem a forquilha são contornadas através de diferentes mecanismos como: ação das polimerases de translesão, pela remoção através de mecanismos de reparo por excisão de nucleotídeos ou por recombinação homóloga. Porém, em condições onde ocorra acúmulo dessas barreiras e/ou disfunções que alterem os mecanismos de reparo, a forquilha de replicação pode colapsar (LAMBERT; CARR, 2005). O colapso da forquilha de replicação é caracterizado pela dissociação do replissomo podendo levar a exposição temporária de segmentos de fita simples de DNA (DNAss).

A exposição de DNAss é prejudicial à célula, pois essas regiões estão expostas ao processamento por endonucleases. O processamento do DNAss, por sua vez, pode levar a um quadro mais grave para a célula que é a quebra de dupla fita de DNA (dsDNA). Este tipo de lesão é extremamente tóxica podendo acarretar em deleções, inserções e ainda translocações de segmentos de DNA, o que culmina no quadro de instabilidade genômica (KHANNA; JACKSON, 2001).

### **1.3 Instabilidade genômica**

A instabilidade genômica é caracterizada por alterações estruturais e/ou numéricas nos cromossomos de uma célula, como: o aumento da frequência de mutações de pares de bases, instabilidade de microssatélite (*Microssatellite Instability*- MSI), aneuploidia, entre outros. Quando ocorrem em regiões codificantes de oncogenes ou de supressores tumorais, essas alterações podem ser responsáveis pela mudança do fenótipo celular desencadeando eventos

tumorigênicos como: auto suficiência na sinalização de crescimento, evasão da apoptose, angiogênese e metástase. Por esta razão, a instabilidade genômica pode ser considerada como um dos principais fatores associados ao desenvolvimento do câncer (NEGRINI; GORGOULIS; HALAZONETIS, 2010; WEI DAI, 2014).

#### 1.4 Via de resposta ao dano no DNA

Diante da constante ameaça a integridade do DNA genômico, os organismos eucariotos selecionaram evolutivamente uma via de sinalização responsável por monitorar a presença de estruturas aberrantes presentes no DNA. O nome dessa via de sinalização é via de Resposta ao Dano de DNA- RDD (*DNA damage response*- DDR). A via de RDD identifica as estruturas aberrantes e regula uma série de funções que visam reparar essas estruturas antes que evoluam para uma lesão com caráter deletério para a célula (KASTAN; BARTEK, 2004; BARNUM; O'CONNELL, 2014).

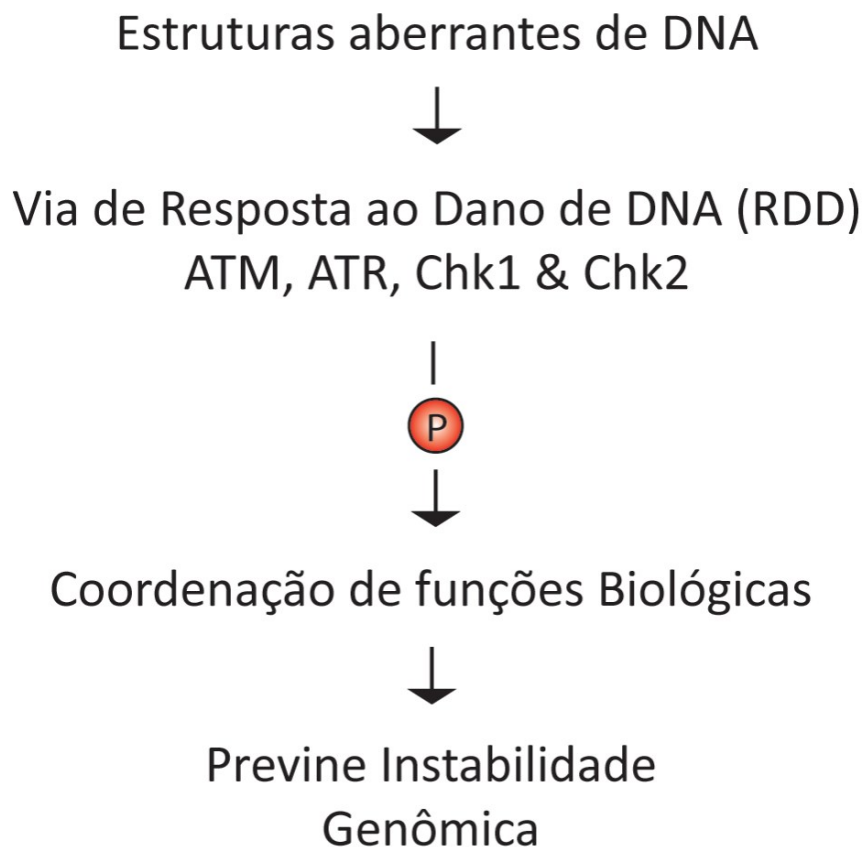
Em células humanas, a via de RDD é regulada pelas quinases sensores ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) e ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein*) e pelas quinases efetoras CHK1/CHK2 (*Checkpoint Kinases 1 and 2*) (Figura 1). Enquanto ATM apresenta uma preferência em reconhecer estruturas aberrantes oriundas de quebras de dupla fita de DNA, ATR tem preferência em reconhecer segmentos expostos de fita simples de DNA (ssDNA). Esses segmentos de fita simples de DNA podem ser gerados pelo processamento de uma lesão de quebra de dupla fita ou, conforme mencionado anteriormente, pelo desacoplamento do replissomo em condições de estresse de replicação (MACDOUGALL et al., 2007; XU; BOOHAKER, 2014). Quando ativadas, ATM e ATR promovem a fosforilação de diferentes substratos incluindo as quinases Chk1 e Chk2. A atividade conjunta de ATM/ATR e Chk1/Chk2 é responsável pela coordenação de inúmeras funções responsáveis pela estabilidade genômica, incluindo a estabilização da forquilha de replicação, aumento na síntese de dNTPs, ativação de mecanismos de reparo de DNA, parada na progressão do ciclo celular e indução da apoptose.

Trabalhos anteriores demonstraram que mutações que alteram as funções dessas quinases são responsáveis pelo aumento da sensibilidade a diversos agentes genotóxicos. Corroborando a importância das quinases da via de resposta ao dano no DNA para a prevenção dos eventos de tumorigênese, trabalhos



epidemiológicos demonstraram que mutações que alteram a função de ATR estão associadas ao desenvolvimento da síndrome de Seckel, enquanto mutações em ATM estão associadas com o desenvolvimento de Ataxia Telangectasia e ainda aumento da predisposição a linfomas, leucemias e câncer de mama. De maneira similar, mutações que afetam a função de Chk1 e Chk2 estão relacionadas com aumento da predisposição a câncer do tipo endometrial, cólon, seios e gástrico (BARTEK; LUKAS, 2003; JACKSON; BARTEK, 2009).

**Figura 1:** Representação da via de RDD

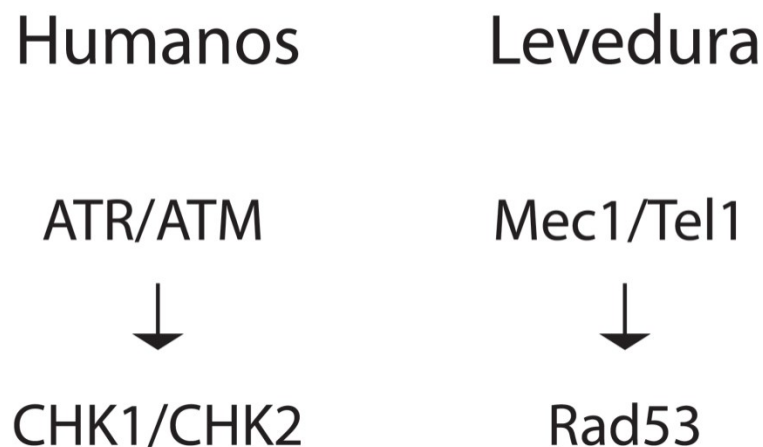


### 1.5 Ortólogos de ATM/ATR e CHK1/CHK2 em *Saccharomyces cerevisiae*

Em *Saccharomyces cerevisiae*, as quinases da via de resposta ao dano no DNA estão representadas sob a forma de ortólogos, onde as quinases sensores ATR/ATM e as quinases efetoras Chk1/Chk2 estão representadas pelas quinases Mec1 (Mitosis Entry Checkpoint 1), Tel1 (TELomere maintenance 1) e Rad53 (RADiation sensitive 53), respectivamente (Figura 2). Trabalhos anteriores demonstraram que o mutante nocaute de Mec1 apresenta sensibilidade aos agentes

genotóxicos, sendo essa sensibilidade aumentada no duplo mutante nocaute Mec1/Tel1 o que sugere que essas quinases tenham papéis redundantes na via de sinalização. Já o mutante nocaute de Rad53 apresenta uma sensibilidade menor do que o duplo mutante *mec1Δtel1Δ*. Além disso, o mutante nocaute de Rad53 não apresenta sensibilidade aditiva ao duplo mutante *mec1Δtel1Δ* o que sugere que Rad53, a jusante de Mec1 e Tel1 (MORROW et al., 1995; LONGHESE et al., 1998).

**Figura 2:** Representação da via de RDD em humanos e leveduras.



### 1.6 Relevância do organismo modelo

*Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura de brotamento utilizada a décadas como organismo modelo para estudos de sinalização celular. Uma das grandes vantagens é ser um organismo unicelular eucariótico que evolutivamente conservou diversas vias de sinalização, incluindo a via de resposta ao dano no DNA. Além de um rápido ciclo geracional, levedura dispõem de um amplo leque de técnicas que possibilitam manipulações genéticas e moleculares que são difíceis de serem executadas em outros organismos modelos, sendo assim uma excelente plataforma de análises para estudos de mecanismo e para eventual transposição para modelos mais complexos.

### **1.7 Identificação dos alvos de MEC1/TEL1 e/ou RAD53**

Utilizando uma abordagem fosfoproteômica quantitativa, Bastos de Oliveira *et al*, 2015 identificaram fosforilações *in vivo* dependentes de Mec1/Tel1 e/ou Rad53 em condições de estresse de replicação.

Dentre mais de 6000 sítios de fosforilação identificados através dessa metodologia, fomos capazes de distinguir 232 sítios cujas fosforilações são reguladas diretamente por Mec1/Tel1 e/ou Rad53. Esses 232 sítios encontram-se distribuídos ao longo de 180 proteínas cujas funções estão relacionadas, principalmente, com replicação de DNA, sinalização de dano ao DNA, reparo de DNA, remodelamento de cromatina e regulação transcricional.

## **2. JUSTIFICATIVA**

As quinases ATR, ATM, Chk1 e Chk2 da via de RDD compreendem uma das principais barreiras biológicas contra o desenvolvimento do câncer. Trabalhos recentes de nosso grupo identificaram inúmeras proteínas fosforiladas pelas quinases Mec1/Tel1 e Rad53 (ortólogos de ATR, ATM e Chk1/Chk2 em leveduras) em condições de estresse de replicação. Nesse contexto, torna-se importante identificar a relevância dessas fosforilações e compreender como regulam a tolerância da célula ao estresse de replicação.

## **3. OBJETIVO**

Estabelecer uma plataforma metodológica para avaliar a relevância funcional dos sítios de fosforilação regulados por Mec1/Tel1 ou Rad53 durante o estresse de replicação.

## 4. MATERIAL E METÓDOS

### 4.1 Linhagens de leveduras e biblioteca de mutantes nocaute

Neste estudo foi utilizada uma biblioteca de mutantes nocaute para os genes não essenciais (Dharmacon - GE Healthcare) de *Saccharomyces cerevisiae*. Nessa biblioteca, todos os mutantes foram gerados pela interrupção do gene alvo pelo "cassete" KanMX. Esse "cassete" é formado pelo gene de bactéria Kan<sup>r</sup> (que codifica uma aminoglicosídeo transferase) sob a regulação do promotor forte do gene TEF do fungo *Ashbya gossypi*. Esse "cassete" possibilita altos níveis de expressão do gene Kan<sup>r</sup> conferindo a levedura resistência ao tratamento com o antibiótico kanamicina. Por essa razão o "cassete" Kan<sup>r</sup> é comumente utilizado como um marcador para seleção de linhagens de levedura. Todos os mutantes da biblioteca foram gerados a partir da cepa de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0).

### 4.2 Condições de crescimento

Todas as cepas foram cultivadas em meio líquido YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose), contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de dextrose, sob agitação de 220 rpm a 30°C.

### 4.3 Meios sólidos

O crescimento das cepas em meio seletivo foi feito em meios *drop-out*, contendo 0,67% Yeast Nitrogen Base without amino acids, meio *drop-out* URA , 2% de dextrose, 2% de agarose.

## 4.4 Varredura genética

### 4.4.1 Critérios para escolha dos mutantes

Em trabalhos anteriores do grupo (Bastos de Oliveira *et al.*, 2015) e de outros grupos (Zhou *et al.*, 2016), foram identificados os alvos fosforilados pelas quinases Mec1, Tel1 ou Rad53 através de abordagens genéticas e análises de fosfoproteômica. A fosfoproteômica é realizada aos pares, entre a cultura selvagem-*wild type* (WT) e uma cultura nocaute para uma das quinases da via de RDD, gerando assim uma comparação entre os alvos fosforilados nas duas culturas, porém para isso é necessário uma diferença estatisticamente significativa entre os alvos fosforilados da cultura WT e da cultura mutante. Para que sejam feitas as análises, foi arbitrariamente escolhido uma diferença de 4x entre os alvos fosforilados na cultura WT e a cultura nocaute, então sugere-se que os alvos que são identificados como fosforilados na cultura WT e não são identificados na cultura nocaute sejam fosforilados pela quinases nocauteadas, gerando um universo de 180 genes para a análise de varredura.

### 4.4.2 Varredura genética primária

Utilizando a biblioteca de mutantes nocaute não essenciais, foram selecionados 180 mutantes cujas as proteínas já foram identificadas como alvos de Mec1/Tel1 e/ou Rad53 em condição de estresse de replicação. Os mutantes foram cultivados em placas de 96 poços contendo 200µl YPD líquido e os antibióticos: geneticina (concentração final: 200µg/ml) e ampicilina (concentração final: 100µg/ml) na estufa à 30°C até atingir a saturação (O.D $\cong$  7,5). Os antibióticos são utilizados para que não ocorra contaminação oriunda de outras cepas que não sejam as selecionadas da coleção, que apresentam esses marcadores ou contaminação por bactérias. As culturas foram submetidas a diluições seriadas (1:10; 1:100; 1:1000) sendo transferidas com o auxílio de um replicador de 96 pinos para placas retangulares contendo YPD sólido na presença ou ausência de agentes genotóxicos. Foram utilizados agentes genotóxicos específicos da fase S do ciclo celular incluindo: hidróxido de uréia (HU) na concentração final de 150mM, metassulfonato de metila (MMS) na concentração final de 0,02% e camptotecina (CPT) na

concentração final de 15µg/ml. Os agentes genotóxicos utilizados agem diferentes formas: o metanosulfonato de metila (MMS) é um agente de amplo espectro, induz dano no DNA através da alquilação das bases nitrogenadas do DNA, a transferência deste grupamento alquil para a base torna-se uma barreira física a progressão da forquilha de replicação gerando o fenômeno conhecido como colapso da forquilha, o hidróxido de uréia (HU) é responsável pela inibição da enzima ribonucleotídeo redutase, responsável pela síntese de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's) na célula durante a fase S, a inibição da enzima promove uma diminuição transitória nas concentrações ou nos níveis de dNTP's gerando o colapso da forquilha e consequente ativação da via de resposta ao dano no DNA. A camptotecina (CPT) promove uma ligação covalente da enzima topoisomerase I com a fita de DNA, impedindo assim que a ligação fosfodiéster rompida seja refeita e formando uma quebra de simples fita de DNA, que durante a replicação irá evoluir para uma estrutura de DNA que está apenas parcialmente replicada, o que mimetiza uma quebra de dupla fita de DNA, durante a fase S.

O crescimento dos mutantes foi avaliado visualmente e registrado a cada 24 horas ao longo de 72 horas de incubação a 30°C. Os mutantes que apresentaram as menores taxas de crescimento quando comparado com o controle foram selecionados para a varredura secundária.

#### **4.4.3 Varredura genética secundária**

Os mutantes selecionados na varredura primária foram cultivados individualmente por aproximadamente 16 h em tubos de vidro á 30° e 220 rpm. A concentração das culturas foi normalizada para uma O.D. 600 nm ~ 0.8 e submetidas a diluições seriadas (1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64) sendo transferidas com o auxílio do replicador de 48 pinos para placas de petri contendo YPD sólido na presença ou ausência dos agentes genotóxicos de interesse utilizados na varredura primária. O crescimento dos mutantes foi avaliado visualmente e registrado a cada 24 horas ao longo de 72 horas de incubação a 30°C. Os mutantes que tiveram o seu fenótipo de sensibilidade confirmado foram selecionados para as etapas subsequentes.

## 4.5 Produção dos mutantes

### 4.5.1 Critérios para seleção dos fosfomutantes

Os mutantes foram selecionados baseando-se em três critérios: 1- sensibilidade ainda não descrita na literatura; 2- função descrita no banco de dados *Saccharomyces Genome Database* (SGD); 3- ortólogo funcional em humanos;

### 4.5.2 Confirmação genotípica dos mutantes Vps72

Com o objetivo de avaliar se a sensibilidade demonstrada pelo mutante Vps72 selecionado na varredura secundária era devido ao nocaute do gene e não devido a mutações pontuais presentes no genoma, foram produzido um novo mutante através da interrupção do gene de Vps72 pelo cassete URA3 (Orotidina-3-fosfato descarboxilase responsável por catalisar a biossíntese *de novo* de pirimidinas). O cassete de URA3 foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase a partir do plasmídeo pRS306 utilizando a enzima Primer Star Max DNA Polimerase para a amplificação dos cassetes autotróficos. A amplificação do produto de PCR foi realizada utilizando tampão 2X PrimerStar Max Premix, 10mM do oligo senso, 10mM do oligo anti-senso, 200ng de amostra e H<sub>2</sub>O destilada estéril com o volume final de 50 µl. As reações foram realizadas utilizando o termociclador usando o programa com 35 ciclos, sendo cada ciclo composto por 3 etapas: desnaturação (98° C por 15 segundos), anelamento (55°C por 10 segundos) e extensão (72°C por 15 segundos).

**Tabela 1:** Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do cassete URA3 para a deleção do gene Vps72.

<b>Oligos utilizados para a confirmação genotípica</b>	
Oligo senso	5'GTCTAATGAATACAAATAGAAGTGAAACCGAAGCAAATTCACAGTGCA CGgcagattgtactgagagtgc-3'
Oligo anti-senso	3'TGGAATATAGTCAAATGTTTAACGACCTACCATTATATAGTCTGTCTCA Atgccgatttcggcctattgg5'

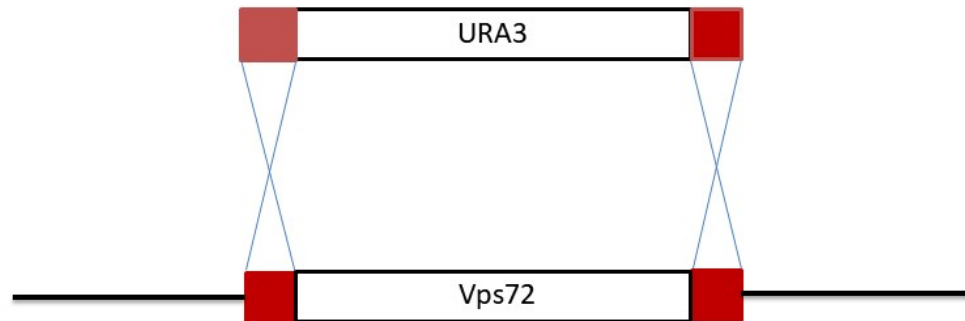


### 4.5.3 Transformação em levedura

A deleção dos genes de interesse foi realizada através do protocolo de transformação em levedura por acetato de lítio. Essa técnica é utilizada para a introdução de um cassete de gene autotrófico no *locus* do gene de *Vps72* (Figura 3). Inicialmente as células de leveduras foram inoculadas em 50 mL de meio YPD (sob as condições descritas no item 4.2) com crescimento durante a noite. No dia seguinte, o crescimento foi avaliado em espectrofotômetro utilizando a densidade óptica de 600 nm. Utilizou-se as culturas com OD entre 0,4-0,8, e em seguida foram centrifugadas por 5 minutos á 1000g em temperatura ambiente (25°C). O precipitado foi lavado com 1 mL de acetato de lítio 100 mM, sendo transferido para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL, logo em seguida foi centrifugado por 15 segundos a aproximadamente 80000g ou 14000 rpm. O sobrenadante é descartado e ao precipitado é adicionado o TRAF0 Mix contendo: 240µl de Peg 50%, 30µl de acetato de lítio 1M e 10 µl ss-DNA (DNA de esperma de salmão) 10µg/µl, deve ser homogeneizado delicadamente. Posteriormente foi adicionado 10µl do produto de PCR (item 4.7.1). A mistura ficou por 40 min no banho maria á 42°C. Ao final do tempo, foi centrifugada por 15 segundos a 6000 rpm, descartando o sobrenadante e ressuspensando as células em 300 µl de H<sub>2</sub>O destilada estéril. As células foram plaqueadas em meio seletivo -URA e incubadas por 48 horas á 30°C.

Após as 48 horas, as colônias isoladas foram estricadas em uma nova placa de meio seletivo -URA para a obtenção de colônias isoladas para posterior confirmação do nocaute.

**Figura 3:** Representação da deleção do gene de interesse pela interrupção utilizando cassete de URA3.



A deleção do gene de Vps72 ocorre através da recombinação homóloga promovida pelo reconhecimento das regiões flaqueadoras presentes tanto no gene quanto no cassete amplificado, promovendo um inserção região-específica.

#### 4.5.4 Extração de DNA

As colônias purificadas da transformação em levedura foram inoculadas em 5 mL de meio YPD (sob as condições descritas no item 4.2). No dia seguinte, não é necessária a avaliação por densidade óptica das culturas, transfere-se 1mL da cultura para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL e em seguida centrifuga-se por 15 segundos a aproximadamente 8000g ou 14000 rpm. Foi adicionado ao pellet: 100 µl tampão A, 100 µl de pérolas de vidro, 100 µl de fenol: clorofórmio (1:1) e 200 µl de TE pH: 8,0, leva-se a mistura para o Disruptor Gene por 5 minutos á aproximadamente 4000g ou 3000 rpm, em seguida centrifuga-se por 5 min a 14000 rpm. Transfere-se 250 µl da fase aquosa para um novo tubo de microcentrifuga de 1,5 mL e adiciona-se 1mL de etanol 100% e 10 µl de acetato de amônia 4M, a mistura deve ser vortexada. Em seguida, a mistura é centrifugada por 5 minutos á 14000 rpm, forma-se um precipitado branco nas paredes do tubo de microcentrifuga e então descarta-se o sobrenadante. O pellet pode ser seco no concentrador á vácuo usando a opção para fenol por 10 min ou mantendo os tubos abertos a temperatura ambiente por 1 hora.

#### 4.5.5 Confirmação do mutante Vps72

Para a confirmação dos mutantes foi realizada uma PCR para a genotipagem com uma combinação de oligos que são capazes de detectar a presença ou ausência do marcador autotrófico no *locus* de interesse. Utilizando-se a enzima Taq Platus DNA Polimerase para a amplificação da ORF do gene de Vps72 . Para a amplificação utilizou tampão 10X com KCl, 8mM de Dntp's, primer senso 10mM, primer anti-senso 10mM, MgCl<sub>2</sub> 25mM, amostra 200ng e H<sub>2</sub>O destilada estéril com o volume final de 30 µl. A amostra utilizada é o DNA purificado, descrito no item . Foram feitas duas mix com misturas diferentes de oligos para revelar os clones positivos (aqueles que sofreram a mutação e integraram o gene autotrófico) e os clones negativos (aqueles que ainda permanecem com o gene de Vps72) (Tabela 2). As reações foram realizadas utilizando termociclador usando o programa com 3 estágios: 1 estágio de desnaturação á 95°C por 3 minutos com apenas um ciclo, 2 estágio com 35 ciclos de desnaturação 94°C por 30 segundos, anelamento á 55°C por 30 segundos e extensão á 72°C por 90 segundos, o último estágio é uma extensão adicional que dura 10 minutos á 72°C. Os produtos foram corados com tampão 6X Loading DNA e corridos contra um padrão de peso molecular 1KB DNA Ladder em um gel de agarose 1%.

**Tabela 2:** Oligonucleotídeos utilizados para a confirmação dos mutantes gerados para Vps72.

<b>Oligos utilizados para confirmação do mutante Vps72</b>		
Mix negativa	Oligo senso	5' GATGCTCTGGCACAAGAG 3'
	Oligo anti-senso	3'TCATCATCGTCATCTTTTGCCATC5'
Mix positiva	Oligo senso	5' GATGCTCTGGCACAAGAG 3'
	Oligo anti-senso	3' TGTCGCTCTTCGCAATGTC 5'

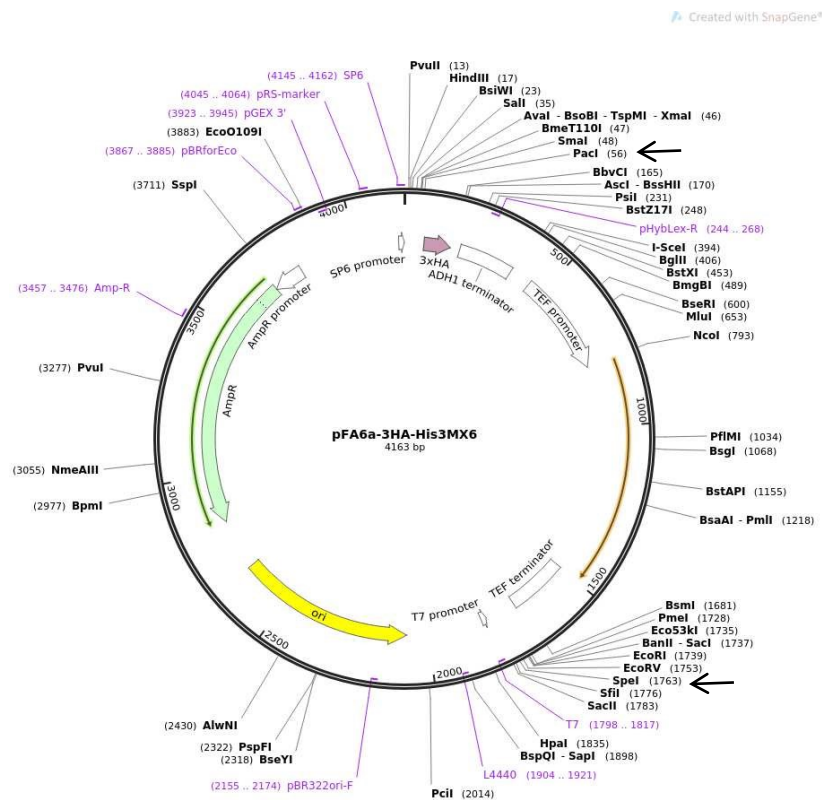
## 4.6 Produção dos fosfomutantes

### 4.6.1 Clonagem

O gene de Vps72 foi amplificado através do PCR descrito no item 4.5.2. O produto gerado pela PCR foi digerido usando as enzimas de restrição Pacl e Spel (NEB) e o tampão CutSmart (NEB) no volume final de 50µl, de igual forma foi feito

com o plasmídeo pFa6a\_G418 6HIS3HA, a reação de digestão é feita no termociclador por 12h á 37°C. Ambas digestões são corridas em um gel de agarose 1% contra um padrão de peso molecular 1KB DNA Ladder para análise através do peso molecular da digestão, para o produto de PCR é corrida apenas uma alíquota de 2µl da amostra, enquanto para a digestão do plasmídeo é corrida toda a amostra. Ambas as digestões necessitam ser purificadas, o produto da digestão oriundo do plasmídeo será sacado do gel utilizando apenas a banda de interesse, enquanto a digestão do produto de PCR será utilizado o volume todo oriundo da digestão, a purificação é feita utilizando o kit QIAquick Gel Extraction seguindo o protocolo do fabricante. Após a purificação os produtos são mensurados utilizando 2µl da amostra no espectrofotômetro, esse é importante para ser utilizado no cálculo para a ligação vetor-inserto utilizando a T4 DNA ligase (NEB) utiliza-se 50ng do vetor purificado, 25ng do produto de PCR purificado, 1µl da T4 DNA ligase e completa-se com água destilada para o volume final de 50µl.

**Figura 4:** Esquema do plasmídeo pFa6a.



As setas destacam os sítios utilizados para a clonagem do gene de Vps72.

Fonte: <https://www.addgene.org/41600/>

#### 4.6.2 Transformação em bactérias competentes e extração de plasmídeo

As bactérias competentes Dh5 $\alpha$  foram feitas segundo o protocolo modificado de *Sambrook et al.*, Protocol 24, o protocolo baseia-se no choque térmico para que promova a competência das bactérias. O plasmídeo gerado através da ligação do vetor com o produto de PCR foi transformado em bactérias através de choque térmico por 90 segundos no banho maria á 42°C e no banho com gelo (0°C) por 2 minutos, utilizando 15 $\mu$ l do plasmídeo. Após o choque térmico, a suspensão é transferida para um falcon contendo 5 mL de meio LB e posteriormente plaqueado em placas de meio LB com ampicilina para a seleção das bactérias que receberam o plasmídeo de interesse. A extração dos plasmídeos é feita utilizando o kit da Qiagen Miniprep Qiaprep utilizando o protocolo do fabricante.

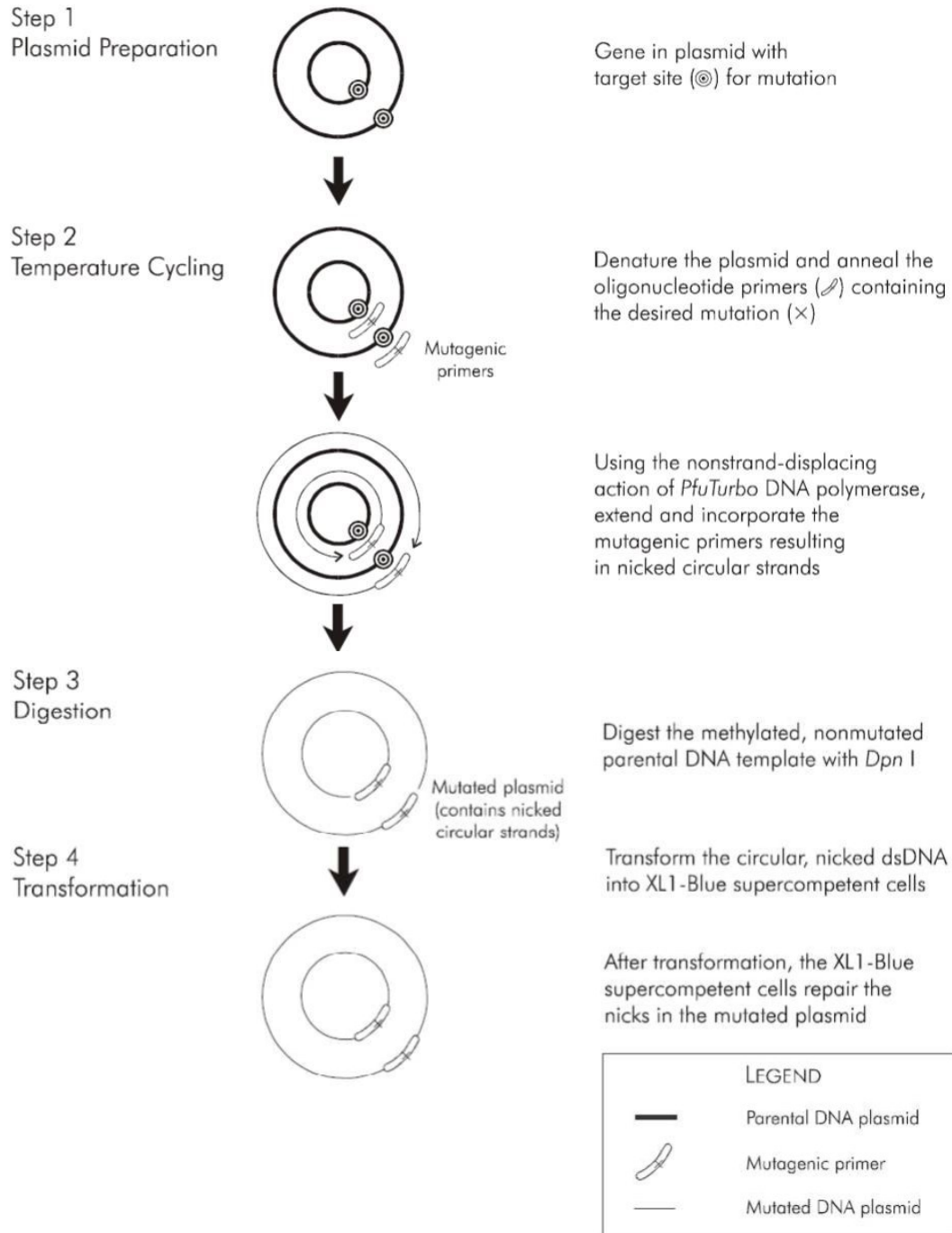
#### 4.6.3 Mutação sitio dirigida

O plasmídeo que foi purificado no item anterior passou pela reação de mutação dirigida utilizando o sistema QuickChange $\rightarrow$  Multiplex (Agilent). Esse kit é capaz de modificar especificamente os sítios, no nosso caso trocando serinas e treoninas por alaninas. Essa reação ocorre em um plasmídeo de DNA dupla fita com a inserção da fase de leitura aberta (*Open Reading Frame-ORF*) do gene de *Vps72* e as regiões montante e a justante (*Upstream* e *Downstream*) do gene. Utilizando a polimerase *PfuTurbo* DNA polimerase é possível sintetizar ambas as fitas com alta fidelidade, além de não deslocar os oligonucleotídeos subsequentes. Com isso promove uma mutação randômica, o que nem sempre gera um fosfomutante final com todas as mutações pontuais. O produto da mutagênese foi tratado com a endonuclease DpnI, essa endonuclease digere a fita parental por conta da especificidade pela fita hemimetilada e metilada, isso ocorre porque as fitas são sintetizadas por cepas de *Escherichia Coli*. Após a digestão, o plasmídeo de fita simples e com os sítios mutados foi transformado em bactérias ultra-competentes XL1-Blue, também fornecida no kit (Figura 5). A especificidade das mutações deve-se ao uso da polimerase de alta fidelidade e das baixas temperaturas durante a reação de PCR, o que diminui a chance de mutações ao acaso.

Foram utilizados os putativos sítios e os sítios já identificados por espectrometria de massas em trabalhos anteriores do grupo (BASTOSDEOLIVEIRA

et al., 2015), utilizando os oligonucleotídeos gerados na página online da empresa Agilent. O plasmídeo foi sequenciado na região do gene de Vps72 para que fosse confirmada a mutação pontual dos sítios de fosforilação.

**Figura 5:** Esquema da Mutagênese Sítio Dirigida.



Fonte: Agilent Technologies.

#### **4.6.4 Integração genômica dos fosfomutantes**

Para a reintegração do fosfomutante no seu *locus* original, foi realizada a transformação em leveduras descrita no item 4.5.3. Utilizando a célula que apresenta a deleção do gene de VPS72 que foi substituído pelo cassete de URA descrito no item 4.5.3. A seleção dos fosfomutantes foi realizada através da capacidade de crescimento em placas com G418 e perda da capacidade de crescimento em placas –URA, demonstrando que o cassete de URA foi substituído pelo fosfomutante.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Varredura primária

Para identificar a relevância funcional dos sítios de fosforilação presentes em 180 alvos das quinases Mec1/Tel1 decidimos, em primeiro lugar, identificar quais dessas proteínas eram importantes para a tolerância da célula a drogas que induzem o estresse de replicação. Essa estratégia permitiu a exclusão de candidatos que não apresentaram relevância funcional, diminuindo assim o número de proteínas utilizadas na segunda etapa do projeto, que consiste na mutação pontual de seus sítios de fosforilação.

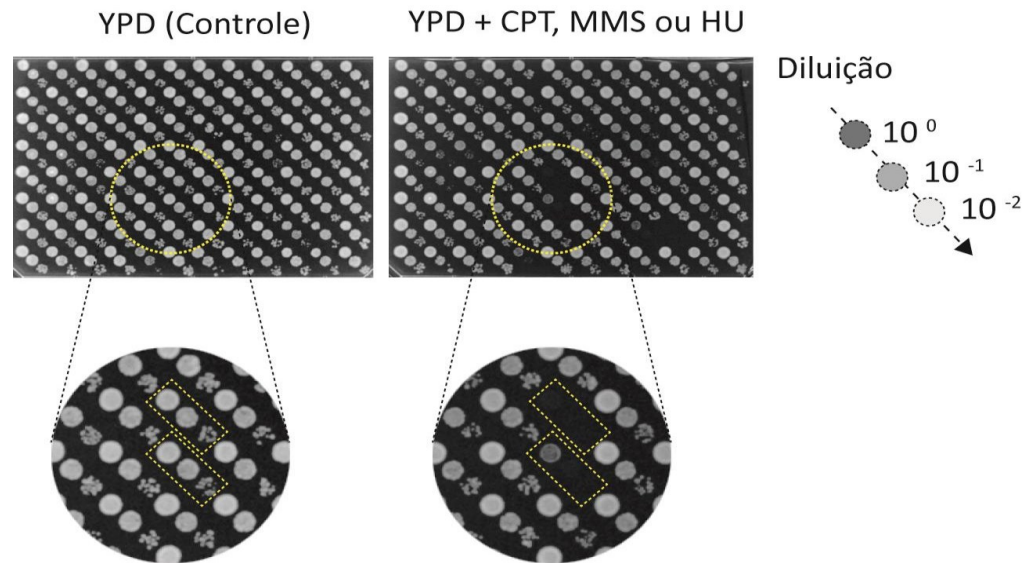
Nesse contexto, 180 mutantes nocautes foram selecionados a partir de uma biblioteca comercial. Cada um desses mutantes correspondia a uma das proteínas identificadas como alvo de fosforilação de Mec1/Tel1 em condições de estresse de replicação.

Esses mutantes foram submetidos a um ensaio de sensibilidade em larga escala na presença de 3 diferentes drogas que induzem o estresse de replicação: Hidróxido de Uréia, Metassulfonato de Metila e Camptotecina (Figura 6).

Para avaliar a sensibilidade desses mutantes o crescimento dos "spots" foi avaliado durante 48 horas. A avaliação da sensibilidade foi feita utilizando como parâmetro a diminuição do crescimento dos "spots" quando comparados com a cepa selvagem.

A diluição seriada permitiu com que nós pudéssemos ter uma avaliação não apenas qualitativa, mas também quantitativa da sensibilidade dos mutantes facilitando a assim a seleção de mutantes com diferentes níveis de sensibilidade. Assim, dentre 180 mutantes testados ao longo da varredura primária, foram identificados 62 mutantes que apresentaram alguma sensibilidade a uma ou mais drogas.



**Figura 6:** Varredura primária.

Culturas dos 180 mutantes nocautes foram diluídas em série (1:10) e aplicadas sob a forma de "spots" em placas contendo meio de cultura sólido na presença de HU, MMS ou CPT. Após 48h de incubação as placas foram fotografadas e o crescimento dos "spots" avaliado visualmente.

**Tabela 3:** Genes que foram confirmados na varredura primária.

<b>Genes que apresentaram sensibilidade na varredura primária</b>			
<b>Gene</b>	<b>MMS</b>	<b>HU</b>	<b>CPT</b>
FUN30	0	0	2
NUP60	2	0	0
SOK2	0	0	0
FDO1	0	0	3
MLH1	0	0	0
SPT21	0	0	1
SGS1	2	3	1
CLA4	2	1	2
TOF1	3	0	1
DIA2	2	2	2
ISW2	2	0	0
APL5	0	0	1
HPC2	2	0	0
RAD55	0	0	0
VPS41	2	0	1
NPL3	3	2	2

RTT107	3	2	2
DCC1	3	2	2
SLX4	3	0	2
SWI6	2	3	2
SEC22	1	2	0
CDC73	3	2	0
NGG1	2	0	0
RAD9	0	0	2
CTF4	2	2	3
UBP13	0	0	0
PDR1	0	0	0
PIB2	0	0	0
DST1	2	0	0
SGF73	2	1	1
GCR2	2	2	0
VID28	1	0	0
RPL2A	1	1	2
TSL1	1	2	1
SAS2	0	1	1
GID8	3	3	3
GCS1	1	0	0
RAD18	3	0	0
RAD26	2	2	0
CBF1	1	0	0
MLP2	0	0	0
RPL17B	0	0	0
RIF1	0	0	0
TUP1	1	0	0
DAL81	3	0	0
MLP1	1	1	3
BSC5	0	0	0
MMS4	2	0	0
MBP1	0	0	0
RXT3	0	0	0
VPS72	2	1	0
RPL1B	3	3	3
RAD54	3	3	2
LTE1	2	0	0
RAD2	2	0	0
DAD3	2	0	0
DEP1	0	0	1
DEF1	3	3	3
PHO81	0	0	0

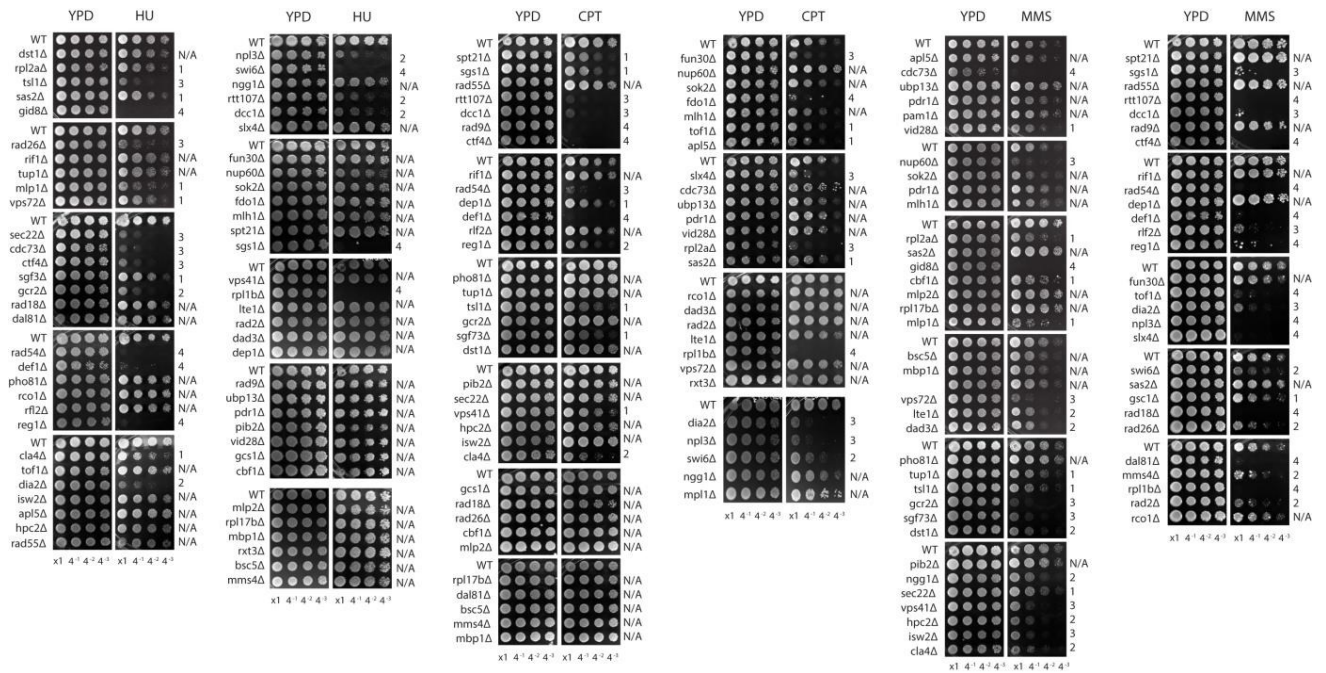
RCO1	0	0	0
RLF2	2	0	0
REG1	2	3	2

As sensibilidades foram definidas de 0-3 sendo 0: crescimento nas 3 diluições e 3: ausência de crescimento nas 3 diluições.

## 5.2 Varredura secundária

Devido a manipulação de um grande número de amostras, abordagens de sensibilidade em larga escala são passíveis de erros experimentais que podem introduzir resultados falso positivos. Para evitar a seleção de candidatos falso positivos, foi conduzida uma segunda rodada experimental para re-validar os candidatos isolados na varredura primária. Assim, os 62 mutantes que apresentaram sensibilidade na varredura primária tiveram a sua sensibilidade reconfirmada por uma varredura secundária. Essa varredura secundária baseia-se nos mesmos parâmetros utilizados na varredura primária, com a diferença de que a diluição seriada foi reduzida de 1:10 para 1:4 (Figura 4). O objetivo é que na segunda rodada fosse possível distinguir com maior resolução as diferenças quantitativas na sensibilidade apresentada pelos diferentes mutantes. Ao final da varredura secundária foram reconfirmadas a sensibilidade de 48 mutantes (Figura 7; Tabela 4; Gráficos 1, 2 e 3). Para facilitar a categorização dos diferentes mutantes quanto ao seu grau de sensibilidade, atribuímos uma pontuação que vai de 1 a 4 onde 4 corresponde ao maior nível de sensibilidade observado (nesse caso, não é possível observar crescimento do "spot" nem na menor diluição 1:4).

Figura 7: Varredura secundária.



Culturas dos 62 mutantes nocautes selecionados na varredura primária foram diluídas em série (1:4) e aplicadas sob a forma de "spots" em placas contendo meio de cultura sólido na presença de HU, MMS ou CPT. Após 48h de incubação as placas foram fotografadas e o crescimento dos "spots" avaliado visualmente. As sensibilidades foram definidas de 0-4, sendo 0 representando o crescimento em todas as diluições e 4 representando a ausência de crescimento em todas as diluições.

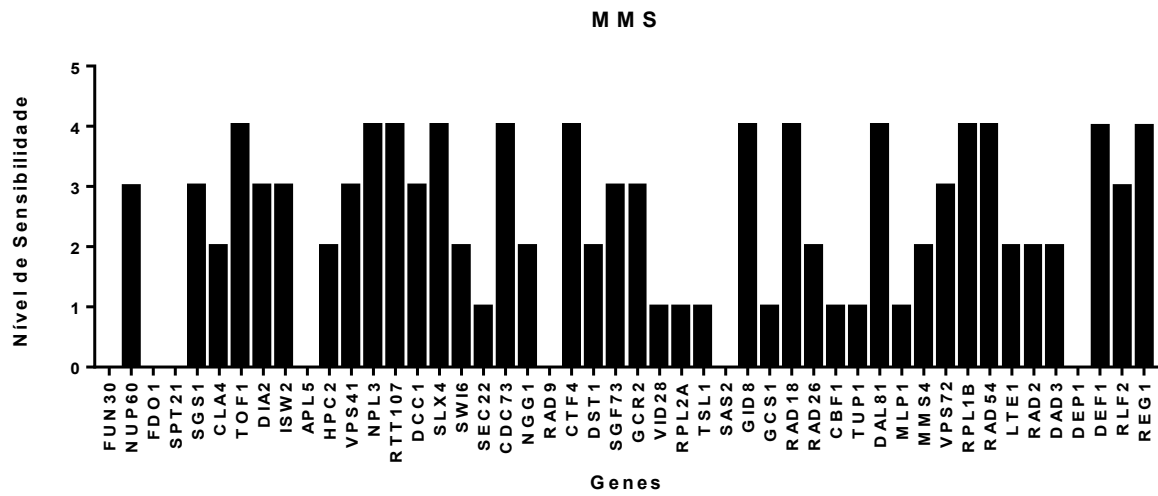
Tabela 4: Genes que tiveram a sensibilidade reconfirmada na varredura secundária.

Genes com sensibilidade reconfirmada na varredura secundária			
Gene	MMS	HU	CPT
FUN30	0	0	3
NUP60	3	0	0
FDO1	0	0	4
SPT21	0	0	1
SGS1	3	4	1
CLA4	2	1	2
TOF1	4	0	1
DIA2	3	2	2
ISW2	3	0	0
APL5	0	0	1
HPC2	2	0	0
VPS41	3	0	1
NPL3	4	2	2
RTT107	4	2	3
DCC1	3	2	3

SLX4	4	0	3
SWI6	2	4	2
SEC22	1	3	0
CDC73	4	3	0
NGG1	2	0	0
RAD9	0	0	4
CTF4	4	3	4
DST1	2	0	0
SGF73	3	1	1
GCR2	3	2	0
VID28	1	0	0
RPL2A	1	1	3
TSL1	1	3	1
SAS2	0	1	1
GID8	4	4	4
GCS1	1	0	0
RAD18	4	0	0
RAD26	2	3	0
CBF1	1	0	0
TUP1	1	0	0
DAL81	4	0	0
MLP1	1	1	4
MMS4	2	0	0
VPS72	3	1	0
RPL1B	4	4	4
RAD54	4	4	3
LTE1	2	0	0
RAD2	2	0	0
DAD3	2	0	0
DEP1	0	0	1
DEF1	4	4	4
RLF2	3	0	0
REG1	4	4	2

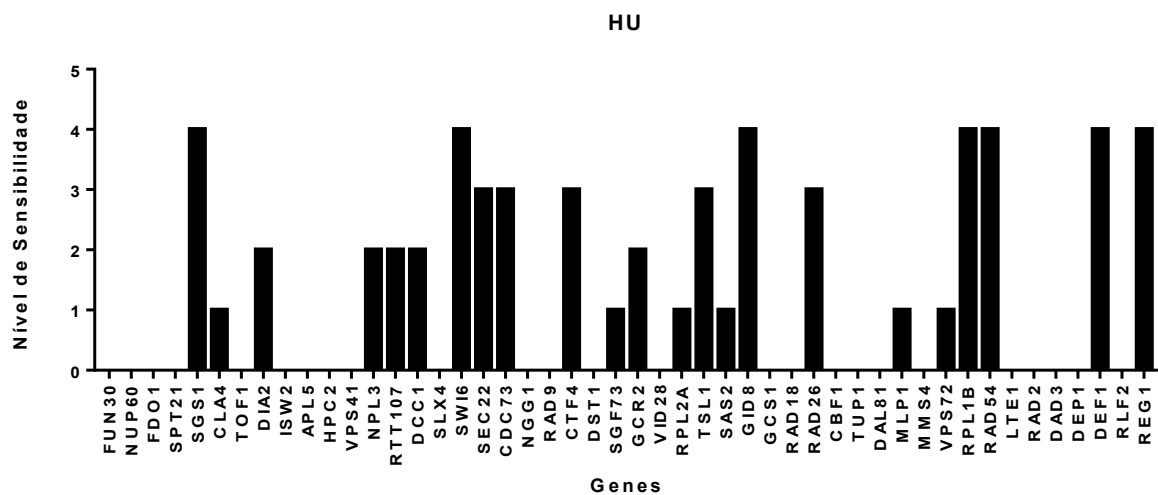
As sensibilidades foram definidas de 0-4 sendo 0: crescimento nas 4 diluições e 4: ausência de crescimento nas 4 diluições. É uma análise qualitativa da sensibilidade de cada um dos mutantes estudados.

**Gráfico 1:** Representação da sensibilidade dos 48 genes selecionados na varredura secundária ao agente genotóxico MMS.



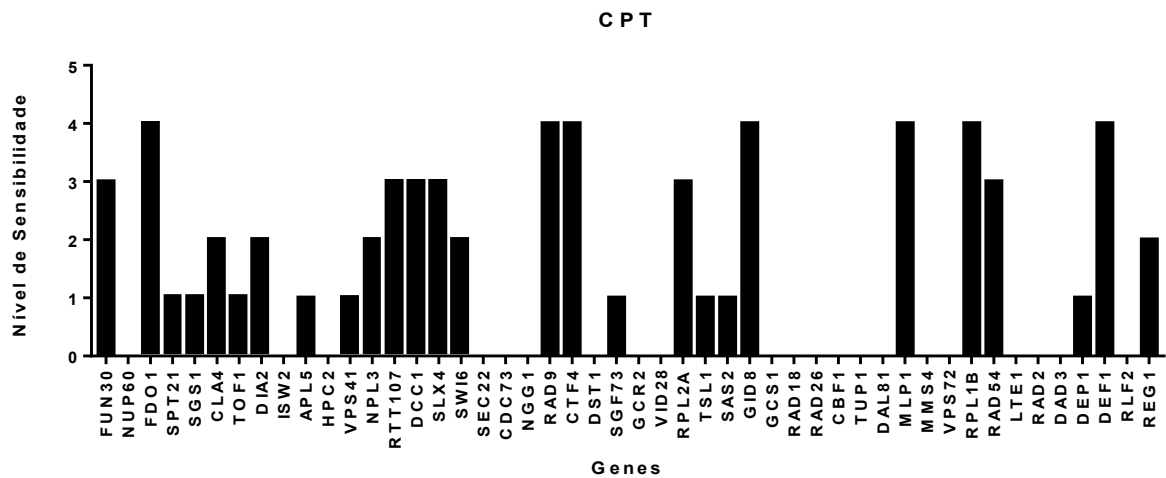
O eixo X representa os valores de sensibilidade que foram obtidos por cada um dos mutantes baseando na ausência de crescimento nas diluições seriadas feitas na varredura secundária, enquanto o eixo Y apresenta os mutantes sensíveis.

**Gráfico 2:** Representação da sensibilidade dos 48 genes selecionados na varredura secundária ao agente genotóxico HU.



O eixo X representa os valores de sensibilidade que foram obtidos por cada um dos mutantes baseando na ausência de crescimento nas diluições seriadas feitas na varredura secundária, enquanto o eixo Y apresenta os mutantes sensíveis.

**Gráfico 3:** Representação da sensibilidade dos 48 genes selecionados na varredura secundária ao agente genotóxico CPT.



O eixo X representa os valores de sensibilidade que foram obtidos por cada um dos mutantes baseando na ausência de crescimento nas diluições seriadas feitas na varredura secundária, enquanto o eixo Y apresenta os mutantes sensíveis.

Uma vez sabendo quais genes eram importantes para a tolerância da célula ao estresse de replicação, estávamos aptos a passar para a próxima fase do projeto que envolvia a mutação dos sítios de fosforilação das proteínas de interesse. Como a abordagem para mutação sítio dirigida é trabalhosa e requer tempo, não teríamos tempo hábil para aplicar a estratégia aos 48 candidatos selecionados. Para definir a escolha de quais genes seriam conduzidos para a próxima etapa foram estabelecidos os seguintes critérios: 1) a sensibilidade deveria ser uma novidade e não ter sido ainda descrita na literatura; 2) a função descrita para o gene no banco de dados de *Saccharomyces cerevisiae* deveria estar de alguma forma associada com funções envolvidas na tolerância ao estresse de replicação; 3) o gene selecionado deveria apresentar um ortólogo humano que justificasse a sua caracterização funcional.

Dentre os 48 mutantes isolados foram categorizados 6 mutantes (tabela 5).

**Tabela 5:** Características dos mutantes selecionados.

Gene	CPT	HU	MMS	Função Biológica <sup>⌘</sup>
<i>DIA2</i>	+*	++	++	E3 ubiquitina ligase (replicação)
<i>NPL3</i>	++*	++	++	Transporte de mRNA
<i>RAD26</i> <sup>#</sup>	N/O	+*	++	Reparo DNA (NER)
<i>TSL1</i>	N/O	++*	N/O	Metabolismo trealose
<i>VPS72</i> <sup>#</sup>	N/O	+	+++*	Remodelador cromatina
<i>MLP1</i> <sup>#</sup>	++	++	++*	Transporte de mRNA

# Gene apresenta homólogo humano

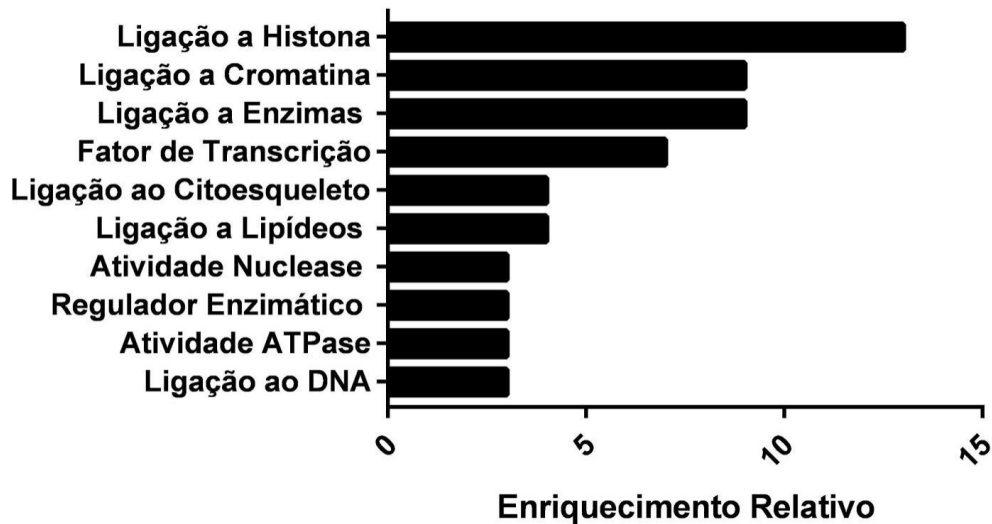
\* Sensibilidade ainda não descrita na literatura

⌘ Função atribuída segundo SGD ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org))

Os candidatos que tiveram a sua sensibilidade reconfirmada na varredura secundária foram analisados através SGD Gene Ontology Slim Mapper para a análise das categorias GO, além disso é possível gerar o dado do enriquecimento relativo das amostras, sendo um cálculo baseado na divisão da porcentagem de genes presentes na amostra em determinada categoria GO pela porcentagem de genes no genoma total de *Saccharomyces cerevisiae* presentes na mesma categoria GO. O gráfico abaixo mostra as 10 categorias que obtiveram um enriquecimento relativo de pelo menos 3 vezes (Figura 8)



**Figura 8:** Representação as categorias *Gene Ontology*



As categorias GO foram obtidas a partir da análise dos mutantes sensíveis à varredura secundária que apresentam um enriquecimento relativo maior ou igual a 3x.

### 5.3 VPS72

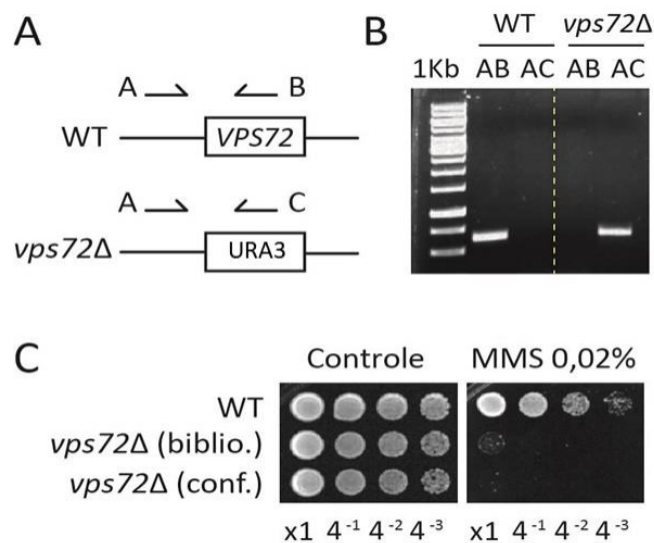
Dentre os candidatos descritos o primeiro candidato para o experimento de mutagênese sítio de dirigida foi VPS72 (Vacuolar Protein Sorting). VPS72 é uma subunidade do complexo remodelador de cromatina dependente de ATP-SWR1 (membro da família SWI2/SNF2), esse complexo usa a energia gerada pela hidrólise do ATP para a troca da histona H2A pela variante de histona H2A.Z.(HTZ1 em leveduras) (VAN ATTIKUM; FRITSCH; GASSER, 2007). Esse complexo é capaz de alterar a estrutura da fibra da cromatina tornando a região mais acessível para o reparo de lesões, principalmente lesões do tipo quebra de dupla fita de DNA.

Entretanto, antes de dar início a mutação dos sítios de fosforilação de Vps72, foi necessário comprovar que a sensibilidade apresentada pelo mutante era devido, de fato, a deleção do seu respectivo gene e não a um efeito aditivo causado pela combinação de mutações em outros genes. Assim, a partir de uma cepa selvagem foi feita a deleção do gene de VPS72 e a sensibilidade do mutante comparada com a sensibilidade do mutante isolado da biblioteca comercial. A

sensibilidade entre ambos os mutantes foi igual, sugerindo que o efeito era exclusivo da deleção de *VPS72* (Figura 9).

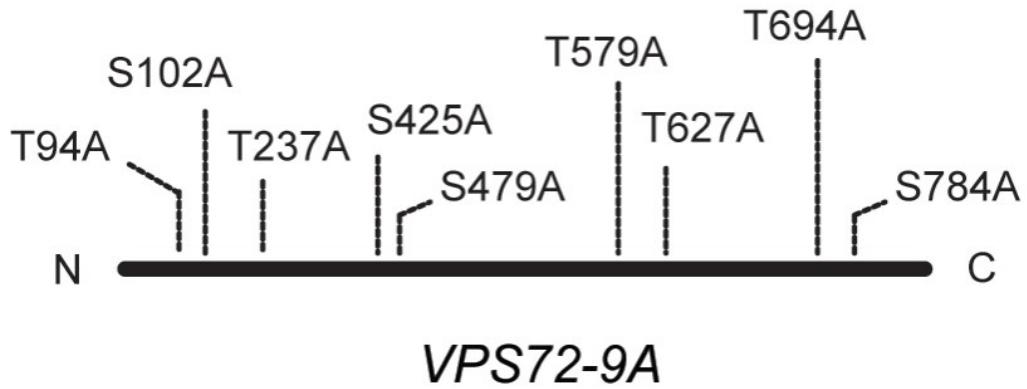
Além do sítio de fosforilação (S425) dependente de Mec1/Tel1, Vps72 apresenta 8 putativos sítios de fosforilação que apresentam o consenso de fosforilação S/T-Q já descritos para as quinases Mec1/Tel1. Nesse contexto, optamos por mutar inicialmente, não apenas o sítio S425 mas também os demais putativos sítios presentes em Vps72. Nesse caso, as serinas treoninas foram substituídas por alaninas, conforme mostra o esquema. Para demonstrar a relevância dos sítios de fosforilação de Vps72, o fosfomutante *vps72-9A* (T94, S102, T237, S425, S479, T579, T627, T694 e S798A) (Figura 10) teve a sua sensibilidade comparada ao mutante nocaute *vps72Δ* através de um ensaio de sensibilidade a MMS (Figura 11)

**Figura 9:** Confirmação da sensibilidade observada para o mutante *vps72Δ* oriundo da biblioteca.

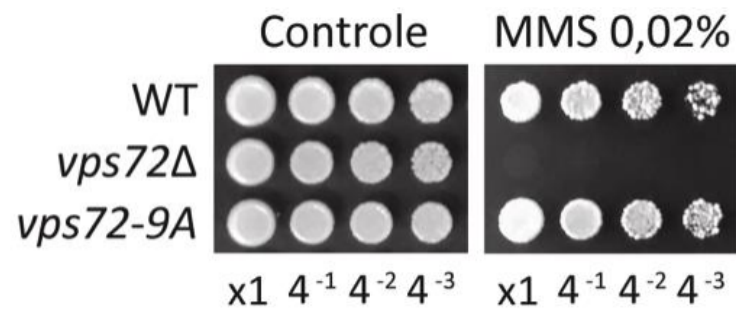


(A) Diagrama dos primers utilizados para confirmar a substituição de *vps72* pelo cassete de URA3, amplicon do gene *Vps72*: aproximadamente 550pb e do cassete de URA3 aproximadamente 1300 pb. (B) Confirmação da substituição de VPS72 pelo marcador de URA3 no mutante confirmatório. (C) Linhagem selvagem teve o gene *vps72* substituído pelo marcador URA3 e sua sensibilidade a MMS foi comparada a sensibilidade do mutante isolado da biblioteca.

**Figura 10:** Representação dos sítios de fosforilação que foram mutados no fosfomutante *vps72-9A*.



**Figura 11:** Teste de sensibilidade do fosfomutante *vps72-9A*.



Linhagem selvagem teve o gene *Vps72* substituído pelo fosfomutante *vps72-9A* e a sua sensibilidade a MMS foi comparada a sensibilidade da célula selvagem e da célula nocaute para *VPS72*.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Análise dos mutantes sensíveis

As quinases da via de RDD são importantes para a tolerância da célula em condições de estresse de replicação. A disfunção dessas quinases encontra-se associada com um aumento na sensibilidade a agentes genotóxicos como HU, MMS e CPT. Para melhor compreendermos os mecanismos através dos quais essas quinases contribuem para a tolerância ao estresse de replicação é fundamental conhecermos quais as proteínas são fosforiladas por essas quinases e de que forma essas fosforilações regulam essa tolerância.

Nosso trabalho lançou mão de uma lista de proteínas fosforiladas por Mec1/Tel1 em condições de estresse de replicação para tentar validar a relevância funcional desses sítios de fosforilação.

Utilizando os dados dos mutantes que apresentaram sensibilidade durante as varreduras primárias e secundárias, selecionamos dentre 180 candidatos, 48 genes cujas proteínas demonstraram ser importantes para a tolerância da célula ao estresse de replicação. Através de uma análise de ontologia gênica identificamos dentre os candidatos uma heterogeneidade funcional das proteínas que são fosforiladas por Mec1/Tel1, corroborando com a máxima de que a resposta ao estresse de replicação é uma sinalização complexa que requer a regulação de diversas funções celulares.

Dentre as funções enriquecidas temos as proteínas que são fatores de transcrição sendo responsáveis por regular a transcrição de genes alvo, podendo ser uma regulação positiva ou negativa, a associação desses fatores ao DNA ocorre de maneira específica. É notório que os fatores de transcrição estariam auxiliando na regulação de genes que codificam proteínas envolvidas nas mais diversas formas de reparo das lesões no DNA, porém mais recentemente foi demonstrado que além da função como fator de transcrição alguns ainda podem participar fisicamente como mediadores chave do reparo, isto ocorre através da translocação dos fatores de transcrição para os locais das lesões no DNA e estes agem facilitando o reparo, isto foi demonstrado principalmente no reparo de quebra de dupla fita e por reparo de

excisão de nucleotídeos (NER) e sugere-se que o mesmo ocorra para as demais vias de reparo de lesões no DNA. (MALEWICZ; PERLMANN, 2014)

Proteínas que interagem com o citoesqueleto são essenciais para a manutenção da estabilidade genômica, um exemplo disso é o gene *DAD3* que codifica a proteína Dad3, subunidade do complexo DAM1 responsável pela segregação dos cromossomos durante a mitose através da ligação ao cinetócoro. Dad3 foi identificado sendo regulado por Mec1/Tel1 em resposta ao dano no DNA, ou seja, na ausência de Dad3 ocorre uma segregação imperfeita dos cromossomos gerando quebras de dupla fita (NOGALES; RAMEY, 2009; CHEN et al., 2010).

As endonucleases são enzimas que clivam internamente a cadeia polinucleotídica, promovendo a exposição de regiões mais internas da molécula de DNA. Na varredura feita neste trabalho, foram identificadas três endonucleases: Mms4, Slx4 e Rad2. Slx4 é endonuclease que está envolvida no processamento de DNA, foi relacionada a uma etapa crucial para a resolução de junções *Holliday* na ausência de Sgs1 durante a recombinação homóloga (WYATT; WEST, 2014), também forma complexo com Mms4 ou Slx2 também com função crucial na ausência da helicase Sgs1 durante a recombinação homóloga (CUSSIOL et al., 2017). De forma similar, Rad2, homólogo de XPG em humanos, está relacionado com regulação do ciclo celular e mutações no gene são responsáveis por parada do ciclo celular e encurtamento da vida útil em condições de dano no DNA. (KANG et al., 2014)

A cromatina é definida como um complexo formado por DNA e proteínas que possui como função a condensação do material genético no núcleo dos organismos eucariotos. Por conta da íntima ligação entre o DNA e as histonas é fácil prever que existam modificações no nível da cromatina e das histonas durante a resposta ao dano no DNA e durante a análise de enriquecimento GO, essas categorias mostraram-se com o maior enriquecimento relativo.

O remodelamento da cromatina é essencial para o acesso ao material genético, logo que a maquinada da DDR necessita acessar o DNA para o reparo das lesões, existem diversos complexos multiproteicos que são capazes de modular a estrutura da cromatina utilizando a energia da hidrólise ATP (adenosina tri-fosfato), demonstrando a importância da atividade ATPase para a resposta ao dano ao DNA uma das categorias GO com enriquecimento, comum a todos os complexos remodeladores de cromatina temos as sub unidades ATPases que podem ser de

diferentes super famílias, geralmente essas sub unidades estão relacionadas a helicases (VARGA-WEISZ; BECKER, 2006). São conhecidos alguns complexos remodeladores de cromatina, sendo eles pela sua ATPase: remodelador de cromatina SWI/SNF que apresenta como ATPase Brm ou Brg1 que agem deslizando e ejetando os nucleossomos para o remodelamento da cromatina, o complexo remodelador de cromatina ISWI que apresenta como ATPase Snf2H ou Snp2L que podem mediar tanto o deslizamento dos nucleossomos como o deslocamento de histonas e o complexo INO80 que tem Ino80 como ATPase e tem a mesma forma de ação da ATPase do complexo SWR1. (LUIJSTERBURG; VAN ATTIKUM, 2011)

Uma das respostas mais rápidas para o reparo de lesões na cromatina é a fosforilação da serina 129 na histona H2A, essa fosforilação ajuda no recrutamento de complexos como os remodeladores INO80 e SWR1 (super família SWI/SNF) que são recrutados para quebras de DNA, já foi demonstrado que INO80 facilita essa fosforilação e permite a recuperação do ciclo celular após a parada, enquanto SWR1 tem a seu recrutamento para sítios de DSBs aprimorado pela fosforilação, outros complexos da super família SWI/SNF são requeridos para reparo por recombinação homóloga. Já os remodeladores de cromatina da família ISWI está envolvido com outras fosforilações da histona H2A que ainda não tem a sua função completamente elucidada. (CLAPIER; CAIRNS, 2009)

Sobre as modificações de histonas existem diversos tipos como: fosforilação, acetilação, ubiquitinação, metilação. A fosforilação das histonas pode está ligada ao recrutamento de remodeladores de cromatina como citado no parágrafo acima ou fosforilações mediadas pelas quinases da DDR, essas fosforilação servem como ponte de interação com outras proteínas. Já foi demonstrado que a acetilação das histonas funciona como um modulador da estrutura da cromatina e promove o acesso das proteínas do via de DDR ao DNA lesionado, enquanto a ubiquitinação de histonas já foi demonstrada como sendo importante principalmente para as quebras de dupla fita de DNA, já a metilação é a transferência de um grupamento metil que pode ser uma mono, di ou tri metilação, a di-metilação já foi relacionada com a sinalização para o reparo por união de extremidades não homólogas (NHEJ), enquanto a tri-metilação é considerada como um sinal de inibição ao reparo do dano no DNA. (LUIJSTERBURG; VAN ATTIKUM, 2011; WILLIAMSON et al., 2012). Cada uma dessas modificações são importantes para diferentes contextos de lesões no DNA e formas de ser reparados. Levando em

consideração tudo que já foi abordado sobre a necessidade de acesso ao material genético para que ocorra o reparo das lesões no DNA é justificável a categoria GO de ligação ao DNA, uma vez que é necessário o acesso ao material genética para que a lesão seja identificada e para posterior sinalização para a via de reparo necessária.

Para a ligação aos lipídeos foi demonstrado que logo após a indução de dano no DNA ocorre um aumento da concentração nuclear de fosfoinositídeos, lipídeos da família dos fosfolipídios que representa parte dos lipídeos disponíveis no núcleo celular. A ausência desses fosfoinositídeos ou mutações que afetem a sua função promovem a inibição do recrutamento de ATR para sítios de lesões no DNA por microirradiação, sugerindo que estes lipídeos são importantes para o reconhecimento de lesões, principalmente de exposição de fita simples de DNA.(WANG et al., 2017).

As duas últimas categorias que apresentaram enriquecimento dentro da análise GO foram as categorias de ligação a enzimas e atividade de regulador enzimático. Durante a sinalização de dano ao DNA dependendo do tipo de lesão gerada na molécula de DNA podem ser sinalizadas e posteriormente ativadas diferentes vias de reparo, essas vias apresentam enzimas, ou seja, proteínas com atividade catalisadora das reações, como por ex: a remoção ou mudança de bases ou nucleotídeos mediada pela enzima DNA fotoliase, principalmente de dímeros de pirimidina (SANCAR; SANCAR, 1988), as próprias endonucleases citadas acima, as DNA glicosilases que fazem parte do reparo por excisão de bases que promovem a hidrólise da ligação N-glicosídica entre a desoxirribose e a base nitrogenada (KROKAN; BJORAS, 2013), entre outros exemplos.

## 6.2 VPS72

O gene que codifica a proteína Vps72 (Vacuolar Protein Sorting 72) ou Swc2 (SWRI Complex 2) foi classificado dentro da categoria GO mais enriquecida, a categoria de ligação a histona. VPS72 é uma subunidade do complexo remodelador de cromatina dependente de ATP- SWR1 (membro da família SWI2/SNF2), esse complexo usa a energia gerada pela hidrólise do ATP para a troca da histona H2A pela variante de histona H2AZ (Htz1 em leveduras) (VAN ATTIKUM; FRITSCH; GASSER, 2007). Esse complexo é capaz de alterar a estrutura da fibra da cromatina tornando a região mais acessível para o reparo de lesões, principalmente lesões do

tipo quebra de dupla fita de DNA, além disso, já foi demonstrado que leveduras que não apresentam a variante de histona Htz1 apresentam uma maior sensibilidade a agentes genotóxicos (MIZUGUCHI, 2004). Wu *et al*, 2005 demonstraram que a subunidade Vps72 é o maior componente capaz de se associar com a variante de histona Htz1 mesmo na ausência de outras sub-unidades do complexo e ainda que o domínio responsável por esta interação está localizado dos resíduos 1-281. Através de análise de Blast, Wu *et al*, 2005 demonstrou que a região de interação de Vps72 e a variante de histona Htz1 é conservada entre os metazoários apresentando 26% de identidade e 40% de similaridade incluindo YL-1, subunidade do complexo remodelador de cromatina SRCAP em mamíferos.

Bastos de Oliveira *et al*, 2015 demonstraram que em condição de estresse replicação Vps72 (Swc2) apresenta uma fosforilação dependente de Mec1/Tel1 na serina 425 (S425), além desse sítio Vps72 apresenta mais 9 potenciais sítios de fosforilação SQ/TQ, característicos das quinases Mec1/Tel1 (KIM *et al.*, 1999), esses sítios localizam-se nos resíduos: T94, S102, T237, S425, S479, S579, T627, T694 e S784. Reforçando a importância desses sítios de fosforilação, foi demonstrado que o sítio T237 em leveduras foi evolutivamente conservado na proteína homóloga a Vps72 YL-1 em mamíferos na posição 168 (figura 12).


Por conta de limitação da técnica, não foi possível a criação do fosfomutante 10<sup>a</sup> (os sítios S232 e T237), pois dois sítios estavam muito próximos sendo apenas viável a criação do fosfomutante 9A. Apesar disso, o fosfomutante vps72- 9A não foi capaz de resgatar o fenótipo demonstrado pelo mutante vps72 $\Delta$  sugerindo que para a função de Vps72 dentro do complexo Swr1 em condição de estresse de replicação não depende dos sítios consenso para as quinases da resposta ao dano no DNA.



**Figura 12:** Alinhamento das seqüências da proteína Vps72 e seus respectivos ortólogos.

**A**

ATR - Matsuoka *et al.*, *Science*, 2008  
Mec1 - Bastos de Oliveira *et al.*, *Mol Cell*, 2015



<b><i>S. cerevisiae</i></b>	222	ERIRKHKEQESQHML	<b>T</b> QEERLRI	246
<b><i>S. pombe</i></b>	168	SASANRQKG----	TM <b>T</b> QQQRFEE	186
<b><i>D. melanogaster</i></b>	160	KK-VRVEDY----	MP <b>T</b> QEELLE	178
<b><i>M. musculus</i></b>	160	G---PHCER----	PL <b>T</b> QEELLRE	176
<b><i>H. sapiens</i></b>	160	G---PHCER----	PL <b>T</b> QEELLRE	176

\* \*

Em destaque o sítio de fosforilação T237 conservado desde leveduras até os seres humanos. Fonte: (WU *et al.*, 2005; MATSUOKA *et al.*, 2007; BASTOSDEOLIVEIRA *et al.*, 2015)

## 7. CONCLUSÃO

Considerando a relevância das fosforilações das demais proteínas feitas pelas quinases da via de resposta ao dano no DNA em condição de estresse de replicação, neste trabalho avaliamos a sensibilidade de 180 mutantes não essenciais alvos de Mec1/Tel1 e/ou Rad53 e geramos o fosfomutante Vps72-9A para a validação dos sítios de fosforilação, baseado nos resultados apresentados no item 5 e discutidos no item 6, temos as seguintes conclusões:

- Dentre os 180 mutantes não essenciais cuja as fosforilações são dependentes de Mec1/Tel1 e/ou Rad53, 48 (aproximadamente 27%) apresentam função relevante para a tolerância da célula ao estresse de replicação induzido por MMS, HU e/ou CPT;
- Dentre as 48 proteínas que apresentam função relevante para a tolerância da célula em condições de estresse de replicação induzido por MMS, a proteína Swc2 (ou Vps72), teve a sua função confirmada através da construção independente de um mutante *swc2Δ*;
- A mutação dos sítios de fosforilação: T94, S102, T237, S425, S479, T570, T627 e S784 para alaninas na proteína Vps72 não conferem sensibilidade ao fosfomutante ao tratamento com MMS

## 8. REREFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, JOHNSON, LEWIS, RAFF, ROBERTS, W. **Biologia Molecular da Célula**.

BARNUM, K. J.; O'CONNELL, M. J. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. In: NOGUCHI, E.; GADALETA, M. C. (Ed.). **Anticancer Research**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2014. 1170p. 29–40.

BARTEK, J.; LUKAS, J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. **Cancer Cell**, v. 3, p. 421–429, 2003.

BASTOSDEOLIVEIRA, F. M. et al. Phosphoproteomics Reveals Distinct Modes of Mec1/ATR Signaling during DNA Replication. **Molecular Cell**, v. 57, n. 6, p. 1124–1132, 2015.

CHEN, S. H. et al. A proteome-wide analysis of kinase-substrate network in the DNA damage response. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 12803–12812, 2010.

CLAPIER, C. R.; CAIRNS, B. R. The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 273–304, jun. 2009.

CUSSIOL, J. R. et al. Slx4 scaffolding in homologous recombination and checkpoint control: lessons from yeast. **Chromosoma**, v. 126, n. 1, p. 45–58, 10 fev. 2017.

FINCHAM, J. R. Transformation in Fungi. **Microbiological reviews**, v. 53, n. 1, p. 148–170, 1989.

HALAZONETIS, T. D.; GORGOULIS, V. G.; BARTEK, J. An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. **SCIENCE**, v. 319, n. March, p. 3–7, 2008.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071–1078, 2009.

KANG, M.-S. et al. Yeast RAD2, a homolog of human XPG, plays a key role in the regulation of the cell cycle and actin dynamics. **Biology Open**, v. 3, n. 1, p. 29–41, 15 jan. 2014.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. November, p. 316–323, 2004.

KHANNA, K. K.; JACKSON, S. P. DNA double-strand breaks : signaling , repair and the cancer connection. **NATURE GENETICS**, v. 27, n. march, p. 247–254, 2001.

KIM, S. et al. Substrate Specificities and Identification of Putative Substrates of ATM Kinase Family Members \*. **THE JOURNAL OF BIOLOGY CHEMISTRY**, v. 274, n. 53, p. 37538–37543, 1999.

KROKAN, H. E.; BJORAS, M. Base Excision Repair. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 4, p. a012583–a012583, 1 abr. 2013.

LAMBERT, S.; CARR, A. M. Checkpoint responses to replication fork barriers. **Biochimie**, v. 87, n. 7, p. 591–602, jul. 2005.

LONGHESE, M. P. et al. DNA damage checkpoint in budding yeast. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 19, p. 5525–5528, 1998.

LUIJSTERBURG, M. S.; VAN ATTIKUM, H. Chromatin and the DNA damage response: The cancer connection. **Molecular Oncology**, v. 5, n. 4, p. 349–367, 2011.

MACDOUGALL, C. A. et al. The structural determinants of checkpoint activation. **Genes and Development**, v. 21, n. 8, p. 898–903, 2007.

MALEWICZ, M.; PERLMANN, T. Function of transcription factors at DNA lesions in DNA repair. **Experimental Cell Research**, v. 329, n. 1, p. 94–100, 2014.

MASAI, H. et al. Eukaryotic Chromosome DNA Replication: Where, When, and How? **Annual Review of Biochemistry**, v. 79, n. 1, p. 89–130, 7 jun. 2010.

MATSUOKA, S. et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. **Science**, v. 316, n. 5828, p. 1160–1166, 2007.

MIZUGUCHI, G. ATP-Driven Exchange of Histone H2AZ Variant Catalyzed by SWR1 Chromatin Remodeling Complex. **Science**, v. 303, n. 5656, p. 343–348, 16 jan. 2004.

MORROW, D. M. et al. TEL1 , an *S. cerevisiae* Homolog of the Human Gene Mutated in Ataxia Telangiectasia , Is Functionally Related to the Yeast Checkpoint Gene MEC1. **CELL**, v. 82, p. 831–840, 1995.

NEGRINI, S.; GORGOULIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 220–228, 1 mar. 2010.

NOGALES, E.; RAMEY, V. H. Structure-function insights into the yeast Dam1 kinetochore complex. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 21, p. 3831–3836, 1 nov. 2009.

SANCAR, A.; SANCAR, G. B. DNA Repair Enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, n. 1, p. 29–67, 1988.

VAN ATTIKUM, H.; FRITSCH, O.; GASSER, S. M. Distinct roles for SWR1 and INO80 chromatin remodeling complexes at chromosomal double-strand breaks. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 18, p. 4113–4125, 19 set. 2007.

VARGA-WEISZ, P. D.; BECKER, P. B. Regulation of higher-order chromatin structures by nucleosome-remodelling factors. **CURRENT OPINION IN GENETICS & DEVELOPMENT**, v. 16, p. 151–156, 2006.

WANG, Y. H. et al. DNA damage causes rapid accumulation of phosphoinositides for ATR signaling. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.

WEI DAI, Y. Y. Genomic Instability and Cancer. **Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis**, v. 05, n. 02, 2014.

WILLIAMSON, E. A. et al. Overview for the Histone Codes for DNA Repair. In: **PROG MOL BIOL TRANSL SCI**. [s.l: s.n.]110p. 207–227.

WU, W.-H. et al. Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, n. 12, p. 1064–1071, 20 dez. 2005.

WYATT, H. D. M.; WEST, S. C. Holliday Junction Resolvases. **COLD SPRING HARBOR PERSPECTIVES IN BIOLOGY**, v. 6, p. 1–29, 2014.

XU, B.; BOOHAKER, R. The versatile functions of ATM kinase. **Biomedical Journal**, v. 37, n. 1, p. 3, 2014.

ZEMAN, M. K.; CIMPRICH, K. A. Causes and Consequences of Replication Stress. **NAT CELL BIOL.**, v. 16, n. 1, p. 2–9, 2014.

## Anexo A

<b>Genes analisados na Varredura Primária</b>	
<b>Gene</b>	<b>Trabalho de Origem</b>
FUN30	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
OAF1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
FLC2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
NUP60	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SWH1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
PPR1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SRL2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
IOC2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SOK2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
FDO1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
MLH1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SPT21	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SGS1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
PFK2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
ESC1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
CLA4	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
TOF1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
EXO1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
VHS3	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
DIA2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
ISW2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
TOP1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
ESC8	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
GAL11	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
MAM3	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
APL5	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
PCL8	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
BEM3	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
HOS3	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
HHO1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
HPC2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
VHC1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RAD55	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
VPS41	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
GIS1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
MSH6	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
DPB4	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
EAF1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
BNA7	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
NPL3	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
FRD1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
TPA1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
OPI1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
NAM8	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RTT107	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015

DCC1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
MRC1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
CIT2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SLX4	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RFX1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SWI6	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
TOS4	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RSA3	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
MDH1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
HSL1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RSC1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SLX9	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
MDR1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
ELG1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
ULS1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SLK19	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SWI3	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
NUP2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SEC22	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
TAL1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
ROM2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
CDC73	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
NGG1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
UPC2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
AHA1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RAD9	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
HTA1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SIR4	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
MDS3	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
MSB2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
HAT1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RAD1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
DIG1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
CTF4	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
KAR3	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
PFK1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
LSC2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
HTA2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
PSY4	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
UBP13	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
PDR1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
PIB2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RPL24A	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
DST1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SGF73	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
GCR2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
BNI4	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
PAM1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
URA1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
NOP13	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SSD1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SUM1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
VID28	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015



YTA7	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
OTU1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RPL2A	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SYG1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
FYV10	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RAD50	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
TSL1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
NUP188	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
PHO84	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
EPO1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SAS2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
GID8	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SRO7	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
EFM1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
TGL4	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
BAS1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RSF2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RPL6B	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
HOT1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RRI1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
GCS1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SSB1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
MAF1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
HCM1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RAD18	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
BBC1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
LYS14	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RAD26	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
CBF1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
DUN1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
NRM1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
HHF1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
NMA111	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
HSP26	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
PHO23	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
MLP2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RPL17B	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RIF1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
VPS71	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SNT1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
TUP1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
DAL81	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
HSP12	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
MLP1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
BSC5	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
EAF3	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
SPT7	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
MMS4	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
ICS2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
STP4	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
MBP1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RXT3	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RPL27B	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015

VPS72	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
PLM2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
GIN4	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
GRX2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
PMD1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RPL1B	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RAD54	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
LTE1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RAD2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
BDF1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
FES1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
CYC8	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
HPR1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
DAD3	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
DEP1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
TPS3	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
YOR385	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
ISW1	Zhou <i>et al.</i> , 2016
GGA1	Zhou <i>et al.</i> , 2016
GGA2	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
LEU3	Zhou <i>et al.</i> , 2016
DEF1	Zhou <i>et al.</i> , 2016
MRP8	Zhou <i>et al.</i> , 2016
VTC3	Zhou <i>et al.</i> , 2016
PHO81	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015
RCO1	Zhou <i>et al.</i> , 2016
RLF2	Zhou <i>et al.</i> , 2016
CRN1	Zhou <i>et al.</i> , 2016
REG1	Bastos de Oliveira <i>et al.</i> , 2015