

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Complementação de mutação *rad51* de *Saccharomyces cerevisiae* por expressão de *radA* de *Halobacterium salinarum***

ORIENTADA: **Carla Renata dos Santos**

ORIENTADOR: **Profa. Dra. Mônica Bucciarelli Rodriguez**

CO-ORIENTADOR: **Prof. Dr. Sávio Torres de Farias**

BELO HORIZONTE

Dezembro – 2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Complementação de mutação *rad51* de *Saccharomyces cerevisiae* por expressão de *radA* de *Halobacterium salinarum***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de mestre em Genética.

**ORIENTADA: Carla Renata dos Santos**

**ORIENTADOR: Profa. Dra. Mônica Bucciarelli Rodriguez**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Sávio Torres de Farias**

Belo Horizonte

Departamento de Biologia Geral

Instituto de Ciências Biológicas

Dezembro - 2008

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado, me protegendo, amparando, consolando e me dando forças para lutar pelos meus objetivos. À Nossa Senhora do Rosário que sempre intercedeu por mim em todos os momentos de dificuldades.

Aos meus pais, pelo carinho, compreensão, amor e apoio incondicionais, por serem meu porto seguro e exemplo de bondade, honestidade e caráter.

Ao meu filho Rafael que sempre foi, e sempre será a minha fonte de inspiração, razão da minha vida e a luz no meu caminho.

Aos meus irmãos Antônio, Paulo, Tânia, Kátia, Mara, Cácia, por serem meus amigos, meus incentivadores, por estarem sempre ao meu lado e por me apoiarem sempre em tudo.

Aos meus cunhados e cunhadas que fazem parte desta família de doidos por escolha, obrigada por fazerem parte da nossa vida.

Aos meus sobrinhos queridos, que são a alegria da minha vida.

Aos meus afilhados Agner e Fernandinha, por serem tão doces e solícitos.

À Karina, minha irmã-sobrinha, que foi minha maior companheira nestes últimos tempos, que me deu todo o apoio que eu precisei para terminar minha graduação e meu mestrado, me ajudando a cuidar do nosso Rafinha, como se fosse seu filho.

Às minhas irmãs Hélen e Elma, meus sobrinho Igor e Abner, que já não estão entre nós, mas sempre estarão presentes em minhas melhores lembranças e em meu coração.

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora e amiga Mônica por ter me aceitado como sua aluna no Mestrado, mesmo sabendo o trabalhão que eu daria, que teve uma paciência de Jó, quase enfartou, mas permaneceu firme e ainda me aceitou como sua aluna no Doutorado, isso é que ter fibra... Por ser minha terapeuta de plantão, por estar sempre ao meu lado, sendo compreensiva com minhas limitações, me ensinando a ser mais séria e comprometida com meu trabalho. Por manter meus pés no chão, mas sempre ouvindo as minhas idéias, por mais estapafúrdias que fossem.

Ao meu co-orientador, que muito me ajudou nos estudos *in silico* (já que eu era analfabeta nesta área) e teve a paciência em me ensinar o pouco que hoje sei. Pelas reuniões científicas no Pastel, que sempre nos renderam boas idéias para o projeto.

À professora Andréa Maria Amaral Nascimento pela amizade, carinho e conhecimentos compartilhados.

Ao professor Edmar Chartone pela amizade, generosidade, pelo bom humor e constante incentivo e por um ser um exemplo como pessoa e pesquisador.

À professora Adlane Vilas Boas pelo carinho e amizade e disponibilidade em ajudar sempre.

Ao professor José Miguel Ortega que me acolheu em seu laboratório quando eu estava no segundo período da graduação e me aturou até o final do Bacharelado... me ensinando a amar e respeitar o trabalho de pesquisador, que sempre esteve ao meu lado quando eu precisei.

A todos os amigos da Polícia Civil, principalmente à minha equipe de trabalho, Marcos, Luíza, Vanessa e Iesser (membro honorário), ao meu querido chefe Hugo, pelos momentos de companheirismo e de alegria, pelo apoio, pela compreensão nos momentos de nervosismo e estresse(que não foram poucos), estando sempre dispostos a trocar plantões e compreender os atrasos.

Às amigas Shirley e Kelly pelos momentos de pura descontração que me ajudaram a sobreviver ao estresse do mestrado e agora ao do doutorado.

Ao amigo Leandro que sempre me socorreu com meu notebook, quando mais precisei, cobrando preços módicos pelos serviços.

A amiga Luciana Werneck, pelos momentos de descontração e pelo apoio em todos os momentos.

Aos amigos com os quais trabalhei no ICB, que sempre estiveram ao meu lado, e compartilharam seus conhecimentos, amizade e carinho, dos mais antigos aos mais novos: Luciana Bastos, Flávia Cristina, Flavinha, Beth, Rosana, Rosana(Miguel), Ana Raquel, Gilka, Michele, Daniela, Juliana, Flaviane, Cláudia, Mariana, Marco Aurélio, Renan, Ricardo, Tiago, Nivaldo, Suzi, Raquel e tantos outros.

Gostaria de citar todos pelo nome, mas com certeza me esqueceria de algumas pessoas que muito me ajudaram e acabaria cometendo injustiças, por isso agradeço de uma forma geral a todos os amigos dos laboratórios: Genética Molecular e de Microrganismos, Biodiversidade e Evolução Molecular, Diversidade Genética Humana Citogenética Evolutiva, Genética Animal e Humana, Genética Celular e Molecular, Genética de Populações, Genética Humana/Médica, Genética Molecular Protozoários Parasitos, Genética Quantitativa e Conservação Animal, Mutagênese e Neoplasias.

Aos professores Vasco A. C. Azevedo, Anderson Miyoshi, Fabrício Rodrigues dos Santos, Evanguedes Kalapothakis, Santuza Teixeira, Cleusa Graça da Fonseca, Maria Bernadete Lovato, Marisa Bianco Bonjardim, Marta Svartman, Carlos Salas, Eduardo M. Tarazona Santos, José Miguel Ortega, Sergio Costa Oliveira, que gentilmente cederam o uso de equipamentos e espaço em seus laboratórios para o desenvolvimento do trabalho.

Às amigas Andréa Reis, Paixão, Maria Rosa pela paciência, carinho, generosidade e pelas contribuições nos experimentos e na preparação de materiais.

Aos coordenadores, professores e aos amigos do programa de Mestrado em Genética pela ajuda e dedicação, em especial à Flávia, Tiago e Mary por serem tão gentis e me ajudarem sempre.

À minha amiga Marina, que tanto me ajudou quando estava na Secretaria da Genética.

A FAPEMIG pelo apoio financeiro.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore de proximidade envolvendo as três representantes da família de recombinases RecA/Rad51/RadA.

Figura 2: Modelo tridimensional de RadA de *H. salinarum*.

Figura 3: Alinhamento das seqüências das proteínas ScRad51 e HbRadA, indicando as regiões críticas para interação com ScRad51p, ScRad52p e ScRad54p e a homologia dessas regiões.

Figura 4: Alinhamento tridimensional de HbsRadA (modelada a partir de PfRadA) e ScRad51 mostrando a conservação da localização de resíduos importantes para a interação com proteínas do complexo ScRad51 em HbsRadA.

Figura 5: Amplificação do gene *radA* de *Halobacterium salinarum* (linhagens ATCC 19700, ATCC 33171, ATCC 43214) por PCR.

Figura 6: Amplificação do gene *RAD51* de *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem S288c) por PCR

Figura 7: PCR de colônias de transformantes DH5 $\alpha$ -pGEMT-*radA* (ATCC19700).

Figura 8: PCR de colônias de transformantes DH5 $\alpha$ -pGEMT-*RAD51* (S288C).

Figura 9: PCR de colônias de transformantes DH5 $\alpha$ -pYES2-*RAD51*(S288C).

Figura 10: Ensaio de sobrevivência ao MMS.

Figura 11: Ensaio de sobrevivência ao MMS.

**TABELAS**

Tabela 1: Iniciadores para a amplificação por PCR dos genes de interesse neste estudo

**LISTA DE ABREVIATURAS**

Amp – ampicilina

DSB – quebra da dupla fita

dsDNA – DNA dupla fita

HR – Recombinação homóloga

IR – Radiação ionizante

MMS - metilmetanosulfonato

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PI – Ponto isoelétrico

ssDNA – DNA fita simples

## SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 O DOMÍNIO <i>ARCHAEA</i>	14
1.2 <i>HALOBACTERIUM SALINARUM</i> : MODELO PARA ARQUÉIAS	15
1.3 <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> : MODELO PARA EUCARIOTOS	16
1.4 REPARO DE DANOS AO DNA	17
<b>1.5 REPARO DE DANOS AO DNA POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA (FALTA FIG RECOMBINAÇÃO)</b>	21
1.6 REPARO DE DANOS AO DNA POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA NOS TRÊS DOMÍNIOS DA VIDA	22
1.7 A FAMÍLIA DE RECOMBINASES RECA/RAD51/RADA	23
1.7.1 A RECOMBINASE RECA	24
1.7.2 A RECOMBINASE RAD51	25
1.7.3 A RECOMBINASE RADA	26
1.8 ESTUDOS DE COMPLEMENTAÇÃO FUNCIONAL	27
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 LINHAGENS DE MICRORGANISMOS	30
3.1.1 LINHAGENS BACTERIANAS: <i>ESCHERICHIA COLI</i>	30
3.1.2 LINHAGENS DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	30
3.1.3 LINHAGENS DE <i>HALOBACTERIUM SALINARUM</i>	30

	10
<b>3.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES</b>	<b>30</b>
<b>3.2.1.1 ESTOQUE DE MICRORGANISMOS</b>	<b>31</b>
<b>3.2.1.2 ANTIBIÓTICOS</b>	<b>31</b>
<b>3.3 PLASMÍDIOS</b>	<b>32</b>
<b>3.4 INICIADORES PARA A AMPLIFICAÇÃO POR PCR DOS GENES DE INTERESSE NESTE ESTUDO</b>	<b>32</b>
<b>3.5 MÉTODOS</b>	<b>32</b>
<b>3.5.1 ANÁLISES <i>IN SILICO</i></b>	<b>32</b>
<b>3.5.1.1 MODELAGEM DE PROTEÍNAS</b>	<b>32</b>
<b>3.5.2 CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA</b>	<b>32</b>
<b>3.5.3 TRANSFORMAÇÃO DE MICRORGANISMOS</b>	<b>32</b>
<b>3.5.3.1 PREPARAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS ELETROCOMPETENTES (SAMBROOK ET AL., 1989)</b>	<b>33</b>
<b>3.5.3.2 PREPARAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS (GIETZ ET AL., 1995)</b>	<b>33</b>
<b>3.5.4 EXTRAÇÃO DE DNA</b>	<b>34</b>
<b>3.5.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIANO DE BACTÉRIA POR LISE ALCALINA (SAMBROOK ET AL., 1989 COM MODIFICAÇÕES)</b>	<b>34</b>
<b>3.5.4.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE <i>HALOBACTERIUM SALINARUM</i></b>	<b>34</b>
<b>3.5.4.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i></b>	<b>35</b>
<b>3.5.5 TESTE DE MARCAS DE AUXOTROFIAS (GUTHRI E FINK, 1991)</b>	<b>35</b>
<b>3.5.6 ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE (SAMBROOK ET AL., 1989)</b>	<b>35</b>
<b>3.5.7 PURIFICAÇÃO DE DNA EM GEL DE AGAROSE</b>	<b>36</b>
<b>3.5.8 PRECIPITAÇÃO DE DNA (SAMBROOK ET AL., 1989, MODIFICADO)</b>	<b>36</b>

<b>3.5.9 DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO (SAMBROOK ET AL., 1989, MODIFICADO)</b>	<b>36</b>
<b>3.5.10 LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA (SAMBROOK ET AL., 1989, MODIFICADO)</b>	<b>36</b>
<b>3.5.11 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR (SAMBROOK ET AL., 1989)</b>	<b>36</b>
<b>3.5.12 PCR DE COLÔNIAS</b>	<b>37</b>
<b>3.5.13 SEQUENCIAMENTO DE DNA</b>	<b>37</b>
<b>3.5.14 ENSAIO DE SENSIBILIDADE AO METILMETANOSULFONATO (MMS) (COLLAVOLI ET AL., 2008)</b>	<b>37</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>38</b>
<b>4.1 ANÁLISES <i>IN SILICO</i> EVIDENCIARAM A CONSERVAÇÃO ESTRUTURAL DAS PROTEÍNAS RADA DE <i>HALOBACTERIUM SALINARUM</i> E RAD51 DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i></b>	<b>38</b>
<b>4.2 ESTUDOS DE COMPLEMENTAÇÃO FUNCIONAL DE RAD51 DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> POR RADA DE <i>HALOBACTERIUM SALINARUM</i> <i>IN VIVO</i></b>	<b>42</b>
<b>4.2.1 CLONAGEM DE RADA DE <i>HALOBACTERIUM SALINARUM</i> E RAD51 DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> EM VETOR BACTERIANO</b>	<b>42</b>
<b>4.2.2 CLONAGEM DE RADA DE <i>HALOBACTERIUM SALINARUM</i> E RAD51 DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> EM VETOR BIFUNCIONAL PARA EXPRESSÃO EM LEVEDURAS</b>	<b>44</b>
<b>4.2.3 A EXPRESSÃO DE RADA DE <i>HALOBACTERIUM SALINARUM</i> EM <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE COMPLEMENTAÇÃO DE RAD51</b>	<b>45</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>50</b>
<b>6. PERSPECTIVAS</b>	<b>51</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>52</b>

## RESUMO

As proteínas RadA de arqueia e sua homóloga eucariótica Rad51 são recombinases que atuam no reparo de quebras no DNA por recombinação homóloga e pertencem à família de proteínas Rad51/RecA/RadA. Estas proteínas são importantes na estabilidade genômica.

Estudos realizados *in silico* com as proteínas RadA de *Halobacterium salinarum* e Rad51 de *Saccharomyces cerevisiae* mostraram grande similaridade estrutural e conservação espacial de resíduos de aminoácidos essenciais para a atividade de Rad51 no sistema de reparo de DNA. Estes resultados sugeriam a possibilidade de complementação funcional em leveduras deficientes em Rad51 pela expressão de RadA. Com o objetivo de testar esta hipótese, os genes *radA* e *RAD51* foram amplificados por PCR utilizando-se iniciadores desenhados a partir de seqüências disponíveis no GeneBank e clonados em vetores de expressão em leveduras (pYES2). Leveduras mutantes *rad51* foram transformadas com os plasmídios: pYES, pYES-*radA* e pYES-*RAD51*. Para avaliar a capacidade de complementação funcional *in vivo*, foram realizados ensaios de sobrevivência das leveduras transformadas e leveduras selvagens para *RAD51* (transformadas apenas com o vetor) ao metilmetanosulfonato (MMS). O aumento de frequência de leveduras mutantes em *rad51* expressando *radA* de *H. salinarum* que sobreviveram à exposição ao MMS foi um indicativo de que RadA é capaz de complementar parcialmente a função Rad51 no reparo de DNA.

## ABSTRACT

*In silico* studies on the protein structures of *Halobacterium salinarum* RadA and *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 showed a high structural similarity and spacial conservation of critical residues for the DNA repair activity of Rad51. These data suggested the possibility of functional complementation of *Saccharomyces cerevisiae rad51* mutant cells by *Halobacterium salinarum radA* expression. In order to test this hypothesis, the *radA* and *RAD51* genes were cloned into an yeast expression vector (pYES2) after being amplified by PCR from genomic DNA. The *rad51* mutant yeast cells were transformed by pYES2, pYES-*radA* and pYES-*RAD51*. Functional complementation activity was tested by scoring survival frequencies after methylmetanesulfonate (MMS) treatment. Yeast *rad51* cells expressing *Halobacterium salinarum radA* showed a higher survival rate after MMS treatment than the mutant cells that only harbored the vector, but lower than cells expressing the wild-type allele *RAD51*. Therefore, our results suggested that the expression of *Halobacterium salinarum radA* can partially complement the DNA repair function in *Saccharomyces cerevisiae rad51* mutant cells.

← **Formatados:** Marcadores e numeração

## 1. INTRODUÇÃO

Neste estudo utilizamos organismos modelos que pertencem aos domínios *Eukarya* e *Archaea* para iniciar o estudo da conservação funcional das proteínas em diferentes domínios.

O domínio *Archaea* ainda é pouco conhecido, possui uma grande diversidade de representantes cuja maioria vive em ambientes extremos. Devido às características peculiares deste grupo, poucos modelos de estudo para este domínio estão estabelecidos. Um modelo que tem sido muito utilizado é a arqueia halófila *Halobacterium salinarum*, que foi a nossa escolha.

Como modelo para organismo eucarioto, escolhemos *Saccharomyces cerevisiae*, que tem sido usada para tanto há muito tempo.

Como modelo para teste de complementação funcional usamos o gene que codifica Rad51, proteína envolvida em reparo de DNA (especificamente reparo por recombinação homóloga) e os genes de proteínas correlatas.

Na introdução daremos algumas informações sobre o domínio *Archaea*, e os organismos *S. cerevisiae* e *H. salinarum*, sobre reparo de DNA, reparo de DNA por recombinação homóloga e sobre as recombinases que fazem parte deste reparo. Por fim falaremos sobre a complementação funcional e sua importância no estudo de conservação funcional de proteínas.

### 1.1 O domínio *Archaea*

O domínio *Archaea*, antes denominado arqueobactérias, é atualmente bem definido como um grupo monofilético (Woese, 1990, Brown e Dolittle, 1997). O domínio pode ser dividido em quatro filas (*Korarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota*) baseados na sequência de rRNA (Allers et al., 2005).

O filo *Crenarchaeota* compreende a maioria das espécies hipertermófilas. Muitas são autotróficas quimiossintetizantes, constituindo os únicos produtores primários em certos habitats inóspitos. Recentes análises baseadas em sequências de rRNA indicam que *Crenarchaeota* também pode ser encontrada em ambientes de baixa temperatura. Em *Euryarchaeota* encontramos as arqueias halofílicas e as metanogênicas. *Korarchaeota* são hipertermófilas filogeneticamente diferentes de *Crenarchaeota* e são consideradas as arqueias mais primitivas. *Nanoarchaeota* é um taxa criado especialmente para o representante *Nanoarchaeum equitans*, cujas relações filogenéticas são incertas (Huber et al., 2002)

Vários representantes deste domínio tiveram seus genomas seqüenciados, o que mostrou que os genomas de arqueias compartilham características com eucariotos e bactérias. Como bactérias, possuem genes organizados em operons. Mas arqueias e eucariotos também possuem características em comum, no que se refere à replicação, transcrição e tradução de genes. As RNA polimerases de arqueias são mais similares às RNA polimerases de eucariotos que às de bactérias. A RNA polimerase de arqueia possui subunidade extra com homologia com a RNA polimerase de eucariotos que não está presente na enzima bacteriana. Como em eucariotos, a RNA polimerase de arqueias requer elementos transcripcionais básicos como “TATA-binding protein” (TBP), fator de transcrição B (TFB) (Brown e Doolittle, 1997). A iniciação de tradução em Archaea usa metionina como em eucariotos, enquanto bactérias usam a N-formilmetionina (Allers et al., 2005). **Inserir dados de reparo de DNA em arqueias**

## 1.2 *Halobacterium salinarum* : Modelo para arqueias

O fato de ter seu genoma seqüenciado (Ng et al., 2000) e ser de fácil cultivo em laboratório e outras características fazem de *Halobacterium salinarum* um modelo para o estudo do domínio *Archaea*. A eficiência de transformação desta halófila é alta, possui vetores de clonagem e expressão com marcadores para seleção. Estratégias de inativação (knockout) de genes têm sido usadas com sucesso em *H. salinarum*, inclusive com método de seleção e contra-seleção utilizando um gene homólogo ao gene de leveduras *URA3*, que permite a deleção sistemática de todos os genes não essenciais. Além disso ampliações por PCR em larga escala e arranjos de DNA tem sido realizados com grande sucesso. Por ser facilmente lisada em meio hipotônico, análises bioquímicas de proteínas desta arqueia podem ser realizadas com relativa facilidade (revisado por Soppa, 2006).

*Halobacterium salinarum* pertence ao filo *Euryarchaeota* e é uma halófila obrigatória, não sobrevivendo em concentração de NaCl inferior a 1M. Organismos que vivem em ambientes hipersalinos apresentam adaptações fisiológicas como o acúmulo de sais ou íons em seu citoplasma, ou pela síntese de compostos orgânicos intracelulares, denominados solutos compatíveis. Assim, o gênero de halófilos *Halobacterium* bombeia grandes quantidades de  $K^+$  para o interior da célula, superando a concentração extrema de  $Na^+$ . Nestes organismos, as enzimas devem exibir maior tolerância ao sal, tendo em vista que seu funcionamento deverá ocorrer em um ambiente muito concentrado. Muitas apresentam bombas de cloro, que constantemente bombeiam este íon para o interior da célula. As paredes podem conter uma grande quantidade de aminoácidos carregados negativamente, ou

polissacarídeos sulfatados, para interagir com íons  $\text{Na}^+$  presentes no meio, sendo esta interação essencial à integridade da parede (Oren, 1999).

Na natureza *Halobacterium salinarum* está exposta à grande quantidade de irradiação solar que apresenta um desafio à integridade de seu genoma, reforçando a necessidade para possuir um sistema de reparo de danos ao DNA eficiente (DiRuggiero et al., 1999; Grogan, 2000). Isto, e o fato de que *Archaea* é um domínio relativamente inexplorado, desperta o interesse nos tipos de mecanismo de reparo de danos ao DNA que operam dentro deste domínio.

O que está descrito de reparo de DNA em *Halobacterium salinarum*.

### 1.3 *Saccharomyces cerevisiae*: Modelo para eucariotos

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos organismos modelos mais utilizados para estudar outros organismos, interações de proteínas, descobrir estrutura e função de proteínas e várias outras abordagens. Além de possuir características interessantes para o trabalho laboratorial, como não ser patogênica e considerada GRAS (*generally regarded as safe*), ser de fácil crescimento e ser passível de técnicas como transformação, *replica-plating*, isolamento de mutantes, e outros, a levedura *S. cerevisiae* divide técnicas com o também organismo modelo *Escherichia coli*, sendo possível trabalhar com estes dois organismos conjuntamente, o que aumenta as possibilidades de estudos. Linhagens de *E. coli* e *S. cerevisiae* com diferentes genótipos estão facilmente disponíveis. Vetores bifuncionais (estáveis em bactérias e leveduras) podem ser introduzidos em *S. cerevisiae* e funcionar tanto como moléculas replicativas como serem integrados por recombinação homóloga ao genoma. Como a recombinação é quase exclusivamente homóloga em *S. cerevisiae*, é possível que um plasmídeo seja integrado em sítios específicos.

Do ponto de vista científico, esta levedura compreende um dos sistemas eucariotos mais bem conhecidos, sendo que trabalhos na área de fisiologia, bioquímica e genética contribuíram significativamente para a elucidação de mecanismos genéticos mais variados, desde as bases moleculares dos mecanismos de biossíntese celular (replicação, transcrição e tradução, por exemplo) até o conhecimento de mecanismos que controlam o envelhecimento celular e o desenvolvimento neoplásico, passando pela base genética de diversas doenças humanas (Friedberg, 2003).

*S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarioto a ter seu genoma seqüenciado e disponível desde 1996 (Gouffreau et al., 1996). Seus 16 cromossomos, bem caracterizados,

indicaram 6183 ORFs de um genoma extremamente compacto, com apenas 3,18% das ORFs contendo introns.. As informações genômicas sobre a levedura *S. cerevisiae* estão disponíveis em vários bancos de dados distintos, como o *Saccharomyces Genome Database* – SGD (<http://www.yeastgenome.org/>) (Dolinski et al., 2002), o *Martinsried Information Center for Protein Sequences* – MIPS (<http://mips.gsf.de/>) (Mewes et al., 1999; Mewes et al., 2000), o qual contém informações sobre seqüências de proteínas anotadas, e o *Yeast Protein Database* – YPD (<https://www.incyte.com/proteome/database/YPD>) (Costanzo et al., 2000), que possui um conjunto de dados com ênfase em propriedades funcionais e físicas das proteínas. Novas informações são periodicamente incorporadas a esses bancos.

#### 1.4 Reparo de danos ao DNA

Retirar os outros reparos e colocar mais de halobacterium, SOS em archaea e as vias que foram encontradas em archaea

O DNA genômico de todos os organismos está constantemente sujeito a danos que podem ser produzidos espontaneamente, devido à instabilidade de ligações químicas dos nucleotídeos, ou podem ser induzidos por interações de nucleotídeos com compostos químicos ou agentes físicos.

Como alteração espontânea podemos citar a tautomerização (quando a base apresenta sua forma tautomérica menos comum – forma enol), a desaminação (converte citosina em uracila, por exemplo), a despurinização e a despirimidinização (promovem a formação de sítios abásicos) e a oxidação de bases (espécies reativas de oxigênio resultantes desse processo promovem a fragmentação de riboses, perda ou modificação de bases) (Friedberg et al., 1995).

As lesões ao DNA causadas por agentes ambientais compreendem os fotoprodutos da exposição à luz UV (dímeros de pirimidina, 6-4 fotoprodutos); a ligação covalente entre as fitas da dupla-hélice do DNA causada pela exposição do DNA a psoralenos e luz UV, ou mitomicina C, quebras simples e duplas no DNA resultantes da radiação ionizante, como raios X ou raios gama (revisado por Kuzminov, 1999).

O reparo destas diferentes lesões no DNA, com características particulares, requer enzimas e mecanismos de reparo específicos. Há sistemas como o Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER), Reparo por Excisão de Bases (BER), que reconhecem e reparam modificações na topologia do DNA e pareamento incorreto de bases, e o reparo por recombinação, reconhece e repara quebras no DNA (revisado por Friedberg, 2003). Reformular a frase

O reparo de DNA pode ser mutagênico ou não mutagênico. No reparo não mutagênico, a restauração da lesão ao DNA ocorre sem comprometer a integridade do genoma, já no reparo mutagênico, acontecem modificações na seqüência de bases.

O reparo não mutagênico inclui o reparo por reversão direta do dano (fotorreativação enzimática), reparo por excisão de bases, reparo por excisão de nucleotídeos, reparo de mal-pareamentos (*mismatches*). Além disso, para quebras (revisado por Friedberg, 2003) em uma única fita de DNA ou das duas fitas de DNA (dupla quebra), há o reparo por recombinação homóloga, que embora não seja mutagênico em si, pode levar à homozigose se o cromossomo homólogo for usado como molde em células diplóides com danos anteriores à fase S.

O reparo de DNA pode ser mutagênico (reparo sujeito ao erro), é acionado geralmente em situações de alta concentração de lesões e/ou quebras nas fitas de DNA. Nesses casos, a célula utiliza como último recurso o sistema de reparo sujeito a erro, usando polimerases sujeitas ao erro (error-prone) que adicionam uma das quatro bases no local lesado, a fim de garantir a continuidade do processo de replicação. Devido ao fato de não haver a informação precisa (molde), o próprio mecanismo de reparo acaba sendo o causador de uma mutação, pois a chance de introduzir uma base incorreta no DNA é grande. Em *E. coli* o reparo mutagênico ocorre quando o sistema SOS é acionado (revisado por Goodman, 2002).

Em eucariotos o reparo por recombinação não homóloga ou junção de extremidades não homólogas (NHEJ – “non-homologous end joining”), também está sujeito a erro (revisado por Burma et al., 2006).

O reparo por fotorreativação ou reversão direta do dano ao DNA é realizado pelas fotoliases. As fotoliase reconhecem e corrigem as lesões causadas pela radiação UV ao DNA, como o dímeros de pirimidina (CPD) e 6-4 fotoprodutos. Após a absorção de um fóton de luz (300-500 nm), a fotoliase é capaz de quebrar a ligação covalente entre as pirimidinas adjacentes, revertendo a lesão (Sancar, 1994). Por ser dependente de luz, este reparo também é conhecido por “reparo no claro”.

No reparo por excisão, também conhecido como “reparo no escuro”, é realizada a remoção do segmento de DNA que contém a lesão e a outra fita intacta é usada como molde. No reparo por excisão de bases (BER), DNA glicosidases removem a base modificada produzindo um sítio abásico e endonucleases AP clivam a fita que contém o sítio abásico e removem alguns nucleotídeos formando uma lacuna no segmento de DNA. Em *E. coli* a DNA polimerase I (polI) catalisa a adição dos nucleotídeos requeridos, preenchendo esta lacuna, e a DNA ligase une os nucleotídeos (de Vries e Wackernagel, 1992).

O reparo por excisão de nucleotídeos (NER) está envolvido no reparo de lesões que causam distorções no DNA. A endonuclease remove um segmento de 12 a 13 nucleotídeos

contendo a lesão, resultando em uma lacuna. Após a síntese da seqüência de nucleotídeos correta pela DNA polII, a DNA ligase une a fita de DNA originalmente lesada (Friedberg et al., 1995).

O reparo de mal-pareamento de bases ("*Mismatch repair*" MMR), como o nome diz, tem a função de corrigir o pareamento errôneo de bases durante a replicação. O mecanismo de ação do MMR é direcionado por metilação de seqüência GATC na fita que é sintetizada após a replicação. Em *E. coli*, as enzimas Mut reconhecem e se ligam às bases mal pareadas na seqüência GATC. Se somente uma das fitas é metilada na seqüência GATC, a proteína MutH atua como endonuclease sítio específica, clivando a fita não metilada na porção 5' da seqüência alvo. Uma vez ocorrendo a clivagem, a *DNA polimerase III* preenche o espaço que foi retirado e a DNA ligase faz a ligação fosfodiéster. O último passo no processo consiste na metilação dos sítios GATC das fitas recém sintetizadas pela Dam metiltransferase. O reparo de pareamentos incorretos pode levar à excisão de mais de 1000 nucleotídeos de uma das fitas do dsDNA na tentativa de reparar um pareamento incorreto criado durante a replicação (Modrich e Lahue, 1996).

Em *Escherichia coli* o parte do sistema de reparo do DNA é mediado pela Resposta SOS, que é um complexo mecanismo celular induzido devido à interrupção da replicação diante de barreiras no DNA. A indução da resposta SOS promove a expressão de mais de 40 genes presentes no regulon SOS. Estes genes operam na manutenção da integridade da forquilha de replicação, no reparo de lesões, na síntese translesão, e no bloqueio da divisão celular prematura até que as barreiras no DNA tenham sido eliminadas (Friedberg et al., 1995).

A desrepressão dos genes constituintes do regulon SOS ocorre quando a proteína RecA ligada ao ssDNA e em presença de ATP, ativa a autoclivagem do repressor LexA tornando-o inativo. LexA, na sua forma dimérica, liga-se a uma seqüência palindrômica presente na região operadora dos genes SOS impedindo sua transcrição em condições normais de crescimento (Friedberg, 1995). Muitos dos genes regulados positivamente na resposta SOS têm como função o reparo das lesões no DNA e a restauração do processo de replicação. Incluem-se neste grupo os produtos dos genes *uvrA*, *uvrB*, os quais participam do reparo por excisão de nucleotídeos. Outros genes regulados positivamente são *polB*, *dinB*, *umuCD* que codificam para as DNA polimerases: polII, polIV e polV, respectivamente. As proteínas envolvidas no reparo mutagênico são expressas a partir do regulon SOS (revisado por Kuzminov, 1999).

Nos primeiros 5 minutos após a irradiação com luz UV, os genes *recA* e *recN* (envolvidos no reparo do DNA por recombinação) e o gene *sulA* (envolvido na inibição da

divisão celular) são induzidos. O repressor LexA também é induzido nesse período. O grau de expressão destes genes após a indução é 2 - 30 vezes maior do que a expressão constitutiva (revisado por Courcelle et al., 2001). Os genes *umuD* e *umuC* são fortemente expressos 20 minutos após a exposição à luz UV, indicando que numa situação de graves lesões no DNA, ou seja, numa situação em que a síntese normal do DNA não tenha sido restaurada através do reparo não mutagênico, as proteínas envolvidas no reparo mutagênico, UmuD e UmuC, são necessárias (revisado por Courcelle et al., 2001).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, o grupo epistático *RAD6* codifica genes que estão envolvidos na síntese trans-lesão (TLS) e na mutagênese espontânea. Três destes genes são conhecidos por REV1, REV3 e REV7. REV1 codifica para uma proteína da família Y de DNA polimerases (propensas ao erro) que incorpora dCMP ao se deparar com um sítio abásico durante a replicação. A DNA pol ζ (composta pelas subunidade Rev3 e Rev7) coopera com Rev1 para realizar a síntese trans-lesão estendendo o C colocado em oposição ao sítio abásico. Homólogos de Rev1 e Rev3 são encontrados em humanos, camundongos e *Drosophila* (Revisado por Goodman, 2002).

O reparo por NHEJ e por recombinação homóloga atuam em um dos tipos mais sérios de danos que pode ser infligido ao genoma, que é a quebra dupla das fitas de DNA (DSB).

Há muitas formas de produzir DSBs, mas a replicação de DNA é um mecanismo principal por converter lesões na ssDNA em DSBs (Kuzminov, 1999).

DSBs podem surgir de várias fontes diferentes. Exogenamente DSBs são causados por radiação ionizante como Raios X ou gama ou através de várias substâncias químicas radiomiméticas (metilmetanosulfonato – MMS, etilmetanosulfonato – EMS). Endogenamente DSBs podem ser geradas diretamente através de espécies reativas de oxigênio e também podem surgir como consequência de reproduzir um molde de DNA com quebra. Realmente, se uma forquilha de replicação de DNA encontra uma interrupção (corte ou gap no ssDNA) em uma das duas fitas de DNA, esta interrupção será convertida a uma DSB (Kuzminov, 1999). Cortes em DNA pode ser o resultado de numerosas fontes algumas das quais incluem fragmento de Okazaki na fita de movimento lento ou incisão de uma fita de DNA estragada por outro sistema de reparo, como o reparo por excisão de nucleotídeos ou de base (Kuzminov, 1999).

Além destes mecanismos gerais para formação de DSB, DSBs em eucariotos são produzidos por exemplo, em células meióticas, DSBs são introduzidos enzimaticamente durante meiose, assegurando o crossing over de homólogos (Keeney et al., 1997; Haber, 2000a.; Haber, 2000b).

Qualquer que seja a quebra, é um problema particularmente significativa à célula porque eles desafiam a integridade da molécula de DNA e podem conduzir, se não reparado, a perda de informações, rearranjo de cromossomos, e não segregação de cromossomos.

Devido a essas conseqüências potencialmente letais, todos os organismos, de bactérias a eucariotos, apresentam mecanismos para reparar este tipo de lesão ao DNA. Em bactérias, este tipo de dano é reparado principalmente pelo processo de recombinação homóloga de DNA (Kuzminov, 1999), em eucariotos, o DSB é reparado ou por recombinação homóloga ou ligação de extremidades não-homólogas (NHEJ) (Pâques e Haber, 1999). Recombinação homóloga envolve emparelhando do DNA danificado com um par homólogo para copiar qualquer informação perdida do homólogo, reparando com precisão assim o DSB, considerando que NHEJ envolve ligação do DSB sem a necessidade de homologia significativa, pode ser considerada propensa ao erro.

O NHEJ é o processo utilizado com maior freqüência em mamíferos. Nessa via de reparo, as extremidades do cromossomo que sofreu quebra dupla são justapostas e religadas, com a possível perda de um ou dois nucleotídeos no local da ligação. O NHEJ é uma forma rápida de reparo, porém tem maior tendência a erro, ao contrário da recombinação homóloga (Burma et al., 2006).

### **1.5** **Reparo de danos ao DNA por Recombinação Homóloga (falta fig recombinação)**

Recombinação homóloga de DNA é um dos mecanismos primários para o reparo de quebra dupla das fitas de DNA (DSBs). Embora o mecanismo geral seja semelhante em bactérias e eucariotos, as proteínas que estão envolvidas neste processo diferem.

O mecanismo básico de reparo de DNA por recombinação homóloga apresenta as seguintes etapas:

O primeiro passo no processo recombinação homóloga de DNA envolve o processamento da molécula de DNA quebrada de forma que uma região com ssDNA é gerada. Este processo pode ser realizado pela ação de helicases de DNA, nucleases, ou ambos. O próximo passo corresponde à procura para a molécula de DNA homóloga que é seguida imediatamente pela troca das fitas de DNA. Este passo é realizado por proteínas que ligam ao ssDNA e que catalisam a invasão e troca das fitas. O filamento de nucleoproteína resultante é a forma ativa destas proteínas que realizam a invasão e busca por homologia na molécula de DNA. A conseqüência deste evento emparelhando inicial é uma região conhecida por hétero-

duplex no DNA. O terceiro passo envolve a troca recíproca das fitas de DNA, criando uma estrutura de quatro fitas conhecida como uma junção de Holliday. O passo final envolve divisão simétrica da junção de Holliday por uma endonuclease junção de Holliday-específica, produzindo um de dois produtos recombinantes alternativos (Kowalczykowski et al., 1994; West, 1997; White et al., 1997; Lilley e White, 2000). Apesar de diferenças entre os sistemas bacteriano (bem estudado em *E. coli*) e de eucariotos (tendo como modelo *S. cerevisiae*), estes passos básicos permanecem conservados.

### **1.6 Reparo de danos ao DNA por Recombinação Homóloga nos três domínios da vida**

*E. coli* possui caminhos diferentes para o reparo de dupla quebra nas fitas de DNA (Kuzminov, 1999): o caminho de RecBCD que repara quebra dupla das fitas de DNA (DSBs); e o caminho de RecF que principalmente repara aberturas de fita única mas pode reparar DSBs. Ambos dependem da ação da proteína de reparo recombinacional RecA. No caminho de RecBCD, a helicase/nuclease RecBCD gera ssDNA em ambas extremidades da DSB, e também insere proteínas RecA sobre estes ssDNA. No caminho de RecF, helicase de RecQ processa a molécula de DNA quebrada para produzir ssDNA, e o RecO e proteínas de RecR ajudam inserindo proteínas RecA sobre o ssDNA mediante a remoção de proteína de ligação a ssDNA (Kuzminov, 1999).

A recombinação homóloga é estudada extensivamente em eucariotos tendo como modelo a levedura *S. cerevisiae*, mas estudos em mamíferos demonstram a universalidade deste processo (Pâques e Haber, 1999). O sistema de recombinação homóloga em eucariotos pode ser comparada aos sistemas bacterianos, mas, é um processo mais complexo. O reparo de DSBs através de recombinação homóloga requer a participação de outros componentes do grupo epistático de RAD52, que consistem de *RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59*, *MRE11*, *XRS2*, e genes de *RDH54/TID1* (Pâques e Haber, 1999). As funções das proteínas codificadas por estes genes foram estudadas genética e bioquimicamente, contudo, a função precisa de algumas proteínas não foi completamente elucidada.

Estudos bioquímicos revelaram a função de muitas enzimas que participam no processo de recombinação homóloga. Em *E. coli*, foi determinado que o processo de recombinação homóloga envolve a ação de mais de 25 proteínas diferentes (Kowalczykowski et al., 1994), para as quais pode haver homólogos estruturais ou funcionais em arqueias.

O sequenciamento do genoma de várias arqueias tornou possível identificar homólogos estruturais de muitas proteínas envolvidas no processo de recombinação homóloga de DNA. Além disso, algumas destas proteínas foram estudadas bioquimicamente, e há evidências genéticas que apóiam o papel destes genes na recombinação homóloga do DNA (Schmidt et al., 1999).

### 1.7 A família de Recombinases RecA/Rad51/RadA

O pareamento homólogo e a troca das fitas de DNA talvez sejam os passos mais críticos para a recombinação homóloga (Kuzminov, 1999).

Em bactérias, o papel de pareamento homólogo e troca das fitas de DNA é realizada pela proteína RecA (Bianco e Kowalczykowski, 1999). Em eucariotos a proteína Rad51 assume este papel (Ogawa et al., 1993), e em arqueias, este passo é mediado pela proteína RadA (Seitz et al., 1998).

A proteína RecA bacteriana foi o primeiro membro identificado da família das recombinases. Nessa família, incluem-se as proteínas UvsX do bacteriófago T4 (Beernik e Morrical, 1999), RadA de arqueia (Seitz et al. 1998), Dmc1 (Gupta et al., 2001) e Rad51 (Ogawa et al., 1993; Sung, 1994) de eucariotos.

As recombinases da família RecA/Rad51/RadA são proteínas que tem papel chave na recombinação homóloga, que é importante na proliferação celular, manutenção e estabilidade do genoma e na diversidade genética, particularmente em eucariotos. A deficiência em *rad51* é letal em camundongos no início do período embrionário (Tsuzuki et al., 1996). Rad51 humana interage fisicamente com os produtos dos genes supressores de tumores p53, BRCA1 e BRCA2, sugerindo seu possível papel na tumorigênese (Marmorstein et al., 1998).

Apesar de serem considerados ortólogos estruturais e funcionais, RecA, Rad51 e as demais proteínas exibem algumas diferenças. RecA e Rad51 apresentam uma região de 30% de identidade, compreendendo os resíduos de aminoácidos 154 a 374 de Rad51 e 33 a 240 de RecA, um domínio essencial para a recombinação. Além disso, Rad51 apresenta algumas das atividades de RecA, como ligação à simples e dupla fita de DNA, hidrólise de ATP, formação de filamentos de nucleoproteína e formação de DNA héteroduplex (Sung e Robberson, 1995).

### 1.7.1 A Recombinase RecA

O gene *recA* foi originalmente isolado em *E. coli* há mais de trinta anos a partir de uma mutação responsável pela redução dramática no nível de recombinação. Seu envolvimento foi estabelecido para quase todas as vias de recombinação em bactérias. Subseqüentemente, a proteína RecA mostrou possuir muitas atividades bioquímicas: atividade ATPásica dependente de fita simples de DNA (ssDNA) e a dupla fita de DNA (dsDNA), protease DNA e ATP - dependente, anelamento ao DNA estimulado por ATP e atividade de troca de fita de DNA dependente de ATP (Cox, 1999). Após o processamento inicial da extremidade da quebra dupla das fitas de DNA (DSB) pelo complexo RecBCD ou enzimas de RecQ (Anderson e Kowalczykowski, 1997b; Harmon e Kowalczykowski, 1998), a proteína RecA começa uma busca por homologia, e catalisa o pareamento e troca da fita de DNA entre cada das duas moléculas de DNA do par homólogo. O pareamento e troca da fita de DNA mediado por RecA acontecem em uma série de passos distintos: pré-sinapse, sinapse e pós-sinapse. Durante pré-sinapse, a proteína RecA liga-se ao ssDNA, na proporção de um monômero de RecA ligado a três nucleotídeos de ssDNA. A proteína RecA interage com ssDNA de uma maneira não-específica, cooperativa, mas exibe uma preferência por ligar e emparelhar seqüências de DNA rico em G e resíduos de T (Tracy e Kowalczykowski, 1996). A proteína RecA complexa-se ao ssDNA de forma polar e acontece na direção 5' - 3' para gerar um filamento de nucleoproteína helicoidal destro contínuo de RecA denominado o "complexo pré-sináptico" (Stasiak et al., 1984; Egelman e Stasiak, 1986; Stasiak e Egelman, 1986; Stasiak e Egelman, 1994). A formação deste complexo pré-sináptico acontece muito mais prontamente na presença de proteína ligadora a DNA fita simples (SSB). A proteína RecA liga-se pobremente a dsDNA, devido a presença de estrutura secundária em ssDNA, que impede formação de um filamento de nucleoproteína. A proteína de SSB remove essa barreira rompendo a estrutura secundária, e é deslocada subseqüentemente através de proteína de RecA (Kowalczykowski e Krupp, 1987). A formação do filamento de nucleoproteína ativo depende tipicamente da presença de um cofactor como ATP ou dATP, e nesta forma ligada ao ATP, a proteína RecA está em um estado que tem uma afinidade alta por ssDNA.

Na fase sináptica, o filamento de nucleoproteína RecA catalisa a busca por homologia dentro de outra molécula de dsDNA homóloga e trocas fitas de DNA entre as duas moléculas. Primeiro, o filamento de RecA faz uma série de contatos não-homólogos ao acaso com a molécula de DNA dúplice antes de achar a seqüência homóloga.

A estrutura de RecA foi elucidada em 1992. A estrutura do filamento RecA-DNA tem sido amplamente caracterizada por microscopia eletrônica (EM). A proteína RecA liga-se ao

DNA numa estequiometria de 3 nucleotídeos (ssDNA) ou 3 pb (dsDNA) por monômero de RecA formando um filamento helicoidal voltado para a direita denominado filamento de RecA. Uma volta completa da hélice de RecA contém 6 monômeros e os hexâmeros não interagem entre si. A estrutura do filamento de RecA pode assumir duas formas gerais, a comprimida (inativa) ou estendida (ativa). O filamento inativo é formado pela proteína sozinha, pela proteína ligada ao DNA na presença de ADP ou ausência de ATP ou análogos de ATP (revisado por McGrew e Knight, 2003).

Cada monômero de RecA apresenta três domínios. O domínio N-terminal (resíduos 1-33) é formado por  $\alpha$ -hélice e folha  $\beta$  O domínio Central (resíduos 34-268) consiste de 8 folhas  $\beta$  ( $\beta 1 \rightarrow \beta 8$ ) e por 6  $\alpha$ -hélices ( $\alpha B \rightarrow \alpha G$ ). Este domínio contém o sítio de ligação para o ATP, os motivos Walker A (resíduos 66-73) e Walker B (resíduos 195-209), e as regiões de ligação do DNA, designadas L1 (resíduos 157-164) e L2 (resíduos 195-209). Os resíduos 269-352 formam o domínio menos conservado, o domínio C-terminal, que consiste de 3  $\alpha$ -hélices e 2 folhas  $\beta$ . Esse se projeta para fora do filamento de RecA, estabilizando interações entre polímeros do cristal. Os resíduos 329-352 formam uma cauda altamente negativa e desordenada na estrutura do cristal (revisado por McGrew e Knight, 2003). **Acrescentar atividade atpásica.**

### 1.7.2 A Recombinase Rad51

A existência de uma proteína homóloga a RecA em eucariotos foi descoberta em mutantes de *S. cerevisiae* que apresentavam sensibilidade a radiação ionizante e a inabilidade em realizar meiose. Estudos mostraram que um mutante nulo em *rad51* era defeituoso na recombinação meiótica, mitótica e no reparo de DSB. Adicionalmente, foi verificado que a proteína Rad51 apresentava alta similaridade à proteína RecA na seqüência de aminoácidos (Shinohara et al., 1992).

Rad51 de *Saccharomyces cerevisiae* (ScRad51) pertence ao grupo *RAD52*, cujos produtos gênicos estão concomitantemente envolvidos no reparo de dupla quebra da fita de DNA (DSB), bem como em recombinação mitótica e meiótica. Os dez mutantes que fazem parte do grupo *rad52* (*rad50*, *rad51*, *rad52*, *rad54*, *rad55*, *rad57*, *rad59*, *rfa1*, *mre11* e *xrs2*) são sensíveis à radiação ionizante (Friedberg et al., 1995), contudo, todos são viáveis.

A proteína Rad51 apresenta muitas das características bioquímicas da proteína de RecA: a estequiometria de ligação a DNA (um monômero de proteína Rad51 por 3 nucleotídeos de DNA), atividade ATPásica -dependente de ssDNA, e catálise de troca de fita

de DNA, a proteína Rad51 também forma um filamento de nucleoproteína helicoidal destro em DNA, semelhante ao de proteína RecA (Ogawa et al., 1993).

A proteína Rad51 como RecA, forma uma estrutura em filamento que tem papel chave no reparo por recombinação homóloga (filamento pré-sináptico). No entanto, Rad51 tem propriedades distintas de RecA. **colocar as diferenças entre recA e rad51**. ScRad51 liga-se prontamente a DNA simples fita (ssDNA) e dupla fita (dsDNA) (revisado por Cox, 2003). Na reação de troca da fita, na recombinação homóloga, ScRad51 é mais dependente da presença de uma proteína ligadora a ssDNA, (geralmente a proteína de replicação A ou RPA) que RecA (Sugiyama et al. 1997). A função primária desse filamento é localizar seqüências homólogas que podem ser utilizadas como molde para reparar o dano à fita de DNA (Sung et al. 2003).

### 1.7.3 A Recombinase RadA

Um papel para proteína de RadA (Sandler et al., 1996) no reparo de DNA por recombinação homóloga veio da análise genética de uma deleção do gene de *radA* de *Haloferax volcanii* (Woods e Dyall-Smith, 1997) que resultou em taxa de crescimento diminuída, e uma sensibilidade aumentada a agentes que provocam danos ao DNA como irradiação de UV e etil-metano-sulfonato (EMS).

O gene homólogo da proteína RecA do hipertermófilo *Sulfolobus solfataricus*, cuja proteína foi a primeira a ser purificada e estudada bioquimicamente, compartilha muitas das mesmas características bioquímicas de RecA e de Rad51. A proteína RadA é uma ATPase dependente de DNA, forma filamentos de nucleoproteína helicoidal em DNA e catalisa troca de fita de DNA (Seitz et al., 1998). A proteína RadA também liga ssDNA com a mesma estequiometria de RecA e Rad51 (um monômero de RadA para 3 nucleotídeos), e mostra uma preferência por ligar e parear a seqüências de DNA que são ricas em G e resíduos de T (Seitz e Kowalczykowski, 2000). O filamento de nucleoproteína formado pelo proteína RadA de arqueias tem a mesma estrutura helicoidal destra formada por RecA de *E. coli* e Rad51 de *S. cerevisiae* (Egelman e Stasiak, 1986; Ogawa et al., 1993; Seitz et al., 1998).

O monômero de RadA de *Sulfolobus solfataricus* (*SsRadA*) apresenta dois domínios ligados por uma região conectora (linker). O domínio N-terminal (resíduos 10-69) forma um feixe de quatro  $\alpha$ -hélices. A região conectora (resíduos 70-84) possui pequena extensão formando uma fita- $\beta$  e uma  $\alpha$ -hélice. A região C-terminal (resíduos 85-324) é um domínio ATPásico, composto por 9 fitas- $\beta$  flanqueadas por 4  $\alpha$ -hélices (Ariza et al., 2005). As

características bioquímicas de RadA parecem ser mais próximas de Rad51, porém sua taxa de atividade de ATPase é bastante baixa ( $k_{cat} = 0.2 \text{ min}$ ) e a eficiência de troca de fita é bastante pobre (Seitz et al., 1998).

As proteínas de RadA de outras arqueias hipertermófilas de *Desulfurococcus amylolyticus*, *Pyrobaculum islandicum*, e *Pyrococcus furiosus* (*P. furiosus*) possuem atividades bioquímicas semelhantes, também à temperaturas elevadas (Kil et al., 2000; Komori et al., 2000). Em acordo com sua semelhança bioquímica à proteína Rad51 de eucariotos, as seqüências de aminoácidos mostram que as proteínas RadA de arqueias são mais próximas estruturalmente a proteína Rad51 de eucarioto (34-42% idêntico e 53-63% semelhante) que à RecA de *E. coli* (14-17% idêntico e 25-31% semelhante). Análises de domínios da proteína RadA de *P. furiosus* demonstram que a porção C-terminal da proteína que contém o domínio central (Domínio II), possui atividade de ATPase DNA-dependente e atividade de troca de fita de DNA. (Komori et al., 2000).

Células de *H. salinarum* NRC-1 foram irradiadas com UV-B em doses equivalentes a 30 J/m<sup>2</sup> e 5 J/m<sup>2</sup> de UV-B. O perfil transcricional mostrou que apenas 11 genes foram super-expressos 1.5 a 2 vezes mais, em ambas as doses de UV-B. O gene mais fortemente expresso foi *radA1* (vng2473), o homólogo às recombinases Rad51/RecA (Boubriak et al., 2008).

## 1.8 Estudos de complementação funcional

A fácil manipulação de *S. cerevisiae* e ampla caracterização de seu genoma permitem que estudos de complementação de genes de outros organismos sejam desenvolvidos com sucesso. Por exemplo, a caracterização de proteínas envolvidas no processo de glicosilação da levedura metilotrófica *Hansenula polymorpha*, foi realizada através de experimentos de complementação em *S. cerevisiae* (Kim et al., 2006).

Os estudos de complementação são bastante generalizados sendo possível a complementação de mutações em leveduras com genes de organismos bem distantes, como plantas. Subunidades da proteína succinil CoA ligase de tomate, envolvida no ciclo de Krebs, foram utilizadas para complementar mutantes nessas subunidades de *S. cerevisiae* com sucesso, mostrando tanto conservação funcional como estrutural (Studart-Guimarães et al., 2005). Da mesma forma o gene *NHX* de *Arabidopsis thaliana*, que codifica transportador de  $\text{N}^+/\text{H}^+$ , foi capaz de complementar leveduras mutantes *nhx* (Gaxiola et al., 1999).

Estudos de complementação funcional foram realizados expressando RecA de *E. coli* em *S. cerevisiae* mutantes em Rad51. Estes estudos demonstraram que apesar da similaridade e

da homologia funcional entre as proteínas, RecA foi incapaz de complementar a sensibilidade de mutantes Rad51 a UV, MMS e 8-MOP + UVA (Morais et al., 1998). Apesar da similaridade entre as proteínas RecA e Rad51, a proteína RecA não apresenta a porção N-terminal presente em Rad51, importante para a formação do complexo Rad51 e na interação com outras proteínas do complexo Rad52. Falar de MMS Falta falar de pyrococcus como molde e de outras recombinases de arqueias falta parte específica das outras.

Uma grande similaridade em relação à estrutura primária das proteínas não garante a capacidade de complementação funcional plena.

A proteína Rad51 da levedura termotolerante *Pichia angusta* é muito similar à Rad51 de *S. cerevisiae*, apresentando 71,3% de identidade em relação à seqüência de aminoácidos. No entanto em ensaio de complementação funcional, no qual Rad51 de *P. angusta* foi expressa em linhagens de *S. cerevisiae* mutantes em Rad51 foi possível observar apenas uma complementação funcional parcial (Shalgev et al., 2004) entre estas proteínas.

As proteínas RadA de *H. salinarum* e Rad51 de *S. cerevisiae* apesar de apresentarem apenas 35% de identidade em relação à seqüência de aminoácidos, mostraram-se muito conservadas em relação à estrutura tridimensional. Uma vez que apresentam uma homologia tridimensional e funcional, apesar de pertencerem a domínios diferentes, RadA seria capaz de complementar funcionalmente linhagens de *S. cerevisiae* mutantes em Rad51?

## 2. OBJETIVOS

Analisar *in silico* e *in vivo* o potencial de complementação funcional de RadA de *H. salinarum* em linhagem de *S. cerevisiae* mutante em Rad51, por meio de análise de similaridade estrutural e conservação espacial de aminoácidos críticos para a função das proteínas e por meio de estudos de complementação funcional.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Linhagens de Microrganismos

##### 3.1.1 Linhagens Bacterianas: *Escherichia coli*

DH5 $\alpha$ : F-endA1 glnV44 thi-1 *RecA1* relA1 gyrA96 deoR nupG  $\Phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169, hsdR17( $r_{K}^{-}$   $m_{K}^{+}$ ),  $\lambda^{-}$

##### 3.1.2 Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

F3(rad51): Rad51::*LEU2*

F(808): *MATa leu2-3, 112, ura3-52, ade1 -100, his4-549 GAL<sup>+</sup>(wt)*

##### 3.1.3 Linhagens de *Halobacterium salinarum*

ATCC 19700, ATCC 33171, ATCC 43214 (Moore e McCarthy, 1969) **Fenótipo**

#### 3.2 Meios de cultura e soluções

##### 3.2.1 Meios de Cultura e soluções para linhagens bacterianas (Sambrook *et al.*, 1989)

Todos os meios foram esterilizados em autoclave (120 Kgf/cm<sup>2</sup> – 15 minutos) antes de serem utilizados.

- **LB:** Triptona 1%, Extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%. Para meio LB sólido foi acrescentado ágar a 1,5%.

- **SOB:** Bactotriptona 2%, Extrato de levedura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, MgSO<sub>4</sub> 10Mm.

- **SOC:** 10ml de meio SOB, 100 $\mu$ l de glicose 2M, 100 $\mu$ l de Mg<sup>2+</sup> 2M (MgSO<sub>4</sub> 1M + MgCl<sub>2</sub> 1M).

- **2XYT:** Bactopeptona 1%, Extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,0.

### 3.2.1.1 Estoque de microrganismos

O volume de 400µl de glicerol foi adicionado a 1ml de cultura bacteriana e mantido em freezer a -70°C.

### 3.2.1.2 Antibióticos

Os plasmídios utilizados neste estudo conferem resistência à ampicilina, que foi utilizada na concentração final de 100µg/ml, tanto em meio de cultura líquido quanto sólido.

### 3.2.2 Meios de cultura e soluções *Saccharomyces cerevisiae* (Guthrie e Fink, 1991)

Todos os meios de cultura utilizados para leveduras foram esterilizados sob as mesmas condições descritas para bactérias.

- YPD: Extrato de levedura 1%, Peptona 2%, Dextrose 2%.
- SD: YNB sem aminoácido 0,17%, Dextrose 2%, Sulfato de amônio 0,5%.

Para meios sólidos, foi adicionado ágar a 2%

A estocagem de leveduras foi realizada nas mesmas condições descritas para bactérias.

Complemento para meio mínimo (SD) para levedura: Triptofano, Lisina, Histidina: 30µg/ml (concentração final), Leucina, Uracila, Adenina: 20 µg/ml (concentração final)

### 3.2 Meio de cultura para *Halobacterium salinarum*

Casamino-ácidos 0.75%, Extrato de levedura 1.0%, Na<sub>3</sub>-citrato 0.3%, KCl 0.2%, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2.0%, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.005%, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0.02%, NaCl 15.0%, Ágar 2.0%, pH 7.4.

### 3.3 Plasmídios

pGEMT: Vetor de clonagem em bactéria. Amp<sup>R</sup>

pYES2: Vetor bifuncional – pGAL-1, 2µm ori, URA-3, pUC ori, Amp<sup>R</sup>

### 3.4 Iniciadores para a amplificação por PCR dos genes de interesse neste estudo

Tabela 1: Iniciadores para a amplificação por PCR dos genes *radA* e *RAD51*

Gene	Sítios de restrição	Iniciador F (5' – 3')	Iniciador R (5' – 3')
<i>radA</i>	<i>EcoRI</i> / <i>XbaI</i>	CCTGCGGAATTCATGGGCCGGGAT	CGCTCTAGATTATTCGGGCTTCAG
<i>rad51</i>	<i>EcoRI</i> / <i>XbaI</i>	TATGAATTCATGTCCTCAAGTTCAA	ACCTCTAGACTACTCGTCTTCTTC

Sublinhar sítios das enzimas de restrição

### 3.5 Métodos

#### 3.5.1 Análises *in silico*

##### 3.5.1.1 Modelagem de proteínas

As proteínas foram modeladas através do programa SWISS-MODEL (Guex et al., 1997, Schwede et al., 2003; Arnold et al., 2006), utilizando como molde as proteínas com estruturas resolvidas por cristalografia e que apresentavam maior similaridade, em relação a seqüência de aminoácidos, à proteína a ser modelada.

##### 3.5.2 Contagem de células de levedura

Para contagem de células foi utilizada uma câmara de Neubauer, onde foi aplicada uma alíquota de 10 µl e foi coberta com uma lamínula. A câmara de Neubauer é formada por 9 quadrados subdivididos. O quadrado central é dividido em 25 quadrados, que são divididos em 16 quadrados. As células dos 4 quadrados das extremidades foram contadas e foi realizada uma média desse valor. O valor obtido foi então multiplicado por 25 (número total de quadrados). O valor obtido é o valor de células/ml da alíquota em uma diluição de 10<sup>-4</sup>.

##### 3.5.3 Transformação de microrganismos

### 3.5.3.1 Preparação e transformação de bactérias eletrocompetentes (Sambrook et al., 1989)

Foi realizado um pré-inóculo a partir de uma colônia da bactéria escolhida em 100ml de meio 2xYT. Este foi incubado overnight a 37°C com agitação. Utilizou-se 10ml do pré-inóculo para inocular 1 L de meio 2xYT que foi levado para agitação a 37°C até atingir D.O.<sub>600nm</sub> de 0.2-0.25. Resfriou-se o frasco com a cultura em gelo. Após resfriada, a cultura foi centrifugada (10.000 rpm por 10 minutos a 4°C) até total sedimentação das células, com descarte do sobrenadante em seguida. O sedimento foi ressuscitado em 50 ml de glicerol 10% a 4°C e centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores, por 15 minutos. Foram realizadas mais duas etapas de lavagem das células em 100 ml de glicerol 10% a 4°C, com centrifugações nas mesmas condições anteriores. O final foi ressuscitado em 1 ml de glicerol 10% e uma alíquota de 25 µl da ressuspensão foi diluída em 10 ml de glicerol 10%. A D. O. <sub>600nm</sub> foi medida e a ressuspensão diluída com glicerol 10% até a D. O. atingir 0.15. A suspensão foi dividida em alíquotas de 40 µl e armazenada a -90°C.

### 3.5.3.2 Preparação e transformação de leveduras (Gietz et al., 1995)

Uma colônia da levedura selecionada foi utilizada para inóculo em 5ml de meio YPD, que foi mantido a 30°C com agitação por 24 horas. 20 µl dessa cultura foram utilizados para inocular 10 ml de meio YPD, sendo que este foi mantido overnight a 30°C com agitação. As células foram contadas e uma alíquota dessa cultura foi utilizada para inocular 75 ml de meio YPD a uma densidade de  $5 \times 10^7$  células/ml. O crescimento foi acompanhado até atingir uma densidade de 1.6 a  $2.0 \times 10^7$  células/ml, tendo atingido este valor, um volume equivalente a  $1 \times 10^8$  células foi centrifugado por 5 minutos a 7000rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuscitadas em 1ml de H<sub>2</sub>O mili-Q esterilizada. As células foram novamente centrifugadas por 30 segundos a 10.000 rpm e ressuscitadas em 400 µl de LiAc 0.1M, este processo de lavagem com LiAc foi repetido mais uma vez. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se na seguinte ordem: 240 µl de PEG 50% (p/v), 36 µl de LiAc 1M, 25 µl de ss-DNA 2mg/ml (previamente fervido e resfriado em gelo), 50 µl de solução de DNA contendo 1µg de plasmídeo. A mistura foi vortexada e levada a banho-maria 30°C por 30 minutos. Logo após, as células foram submetidas a um choque térmico de 42°C por 30 minutos. As células foram centrifugadas (30 segundos), o sobrenadante foi descartado e as células ressuscitadas em 500 µl H<sub>2</sub>O mili-Q esterilizada. As células foram então plaqueadas em meio seletivo.

Soluções utilizadas:

LiAc dissolvido em H<sub>2</sub>O mili-Q esterilizada em uma concentração de 0,1 e 1M,

PEG 3350 dissolvido em H<sub>2</sub>O mili-Q estéril a 50% (p/v),  
ss-DNA (DNA de esperma de salmão) dissolvido em H<sub>2</sub>O mili-Q estéril (2mg/ml).

### **3.5.4 Extração de DNA**

#### **3.5.4.1 Extração de DNA plasmidiano de bactéria por lise alcalina (Sambrook et al., 1989 com modificações)**

Uma colônia da bactéria selecionada para extração foi inoculada em 5ml de meio LB com antibiótico e levada para crescimento overnight a 37°C com agitação. A cultura foi centrifugada (10.000 rpm – 10 minutos – 4°C). Após centrifugação, a cultura foi ressuspensa em 100µl de GTE. Foram adicionados 200 µl de solução de lise fresca, o tubo foi invertido gentilmente e incubado por 5 minutos em gelo. Foi adicionado 150 µl de KOAc, vortexado e as células lisadas foram centrifugadas (10.000 rpm – 10 minutos – 4°C). O sobrenadante foi recuperado e transferido para tubos eppendorf. Foram adicionados 400 µl de fenol:clorofórmio 1:1, foi vortexado e foi centrifugado o eppendorf por 1 minuto. Foram adicionados 400 µl de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1, foi vortexado e foi centrifugado o eppendorf por 1 minuto. Foram adicionados 400 µl de isopropanol gelado. O eppendorf foi vortexado e levado para o freezer (-20°C) por pelo menos 24 horas. Após incubação, o eppendorf foi centrifugado (14.400 rpm – 15 minutos) e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspensa em 1 ml de etanol absoluto e centrifugado novamente (14.400 rpm – 5 minutos). Descartou-se o sobrenadante e ressuspensa-se o em 20 µl de TE-RNase.

#### **3.5.4.2 Extração de DNA genômico de *Halobacterium salinarum***

As células foram incubadas por cerca de cinco dias em 30ml de meio apropriado a 37°C. Após crescimento, células foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm e aproximadamente 0.05g de células ressuspensas em 540µl de TE (Tris-Cl 10mM-pH 7.4, EDTA 1mM- pH8.0). Foi adicionado 25µl de lisozima (10mg/ml), 100µl de SDS e 3µl de RNase (10mg/ml). A suspensão foi agitada gentilmente e incubada a 37°C por 1 hora. Foram adicionados 3µl de Proteinase K e incubou-se a 55°C por 2 horas. Foi adicionado 100µl de NaCl 5M e agitou-se gentilmente. Foram adicionados 100 µl de CTBA/NaCl (10% CTBA/0.7M NaCl), foi vortexado e incubou-se a 65°C por 20 minutos. Foram adicionados 600 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e agitou-se gentilmente por 10 minutos. A suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm e a fase aquosa retirada. Repetiu-se o

passo de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguido da centrifugação e retirada da fase aquosa. Foram adicionados 700 µl de fenol:clorofórmio (1:1) e agitou-se gentilmente por 10 minutos. A solução foi centrifugada e repetiu-se o passo do fenol: clorofórmio (1:1). Após centrifugação e retirada da fase aquosa, foram adicionados 420µl de isopropanol (6 volumes) e incubado a 20°C por pelo menos 24 horas. Após incubação a solução foi centrifugada por 20 minutos a 10.000 rpm e lavada com etanol 80%. O sedimento foi deixado a temperatura ambiente para secagem e ressuspendido em 20µl de TE.

#### **3.5.4.3 Extração de DNA genômico de *Saccharomyces cerevisiae***

O equivalente a  $1 \times 10^8$  células foram centrifugadas, lavadas com solução salina e ressuspendidas em 800 µl desolução de lise fresca. Pérolas de vidro foram adicionadas à solução e vortexou-se por 1 min, por duas vezes. Após este procedimento o lisado foi incubado em gelo por 10 min. Centrifugou-se por 5 min e o sobrenadante foi transferido para outro dois tubos de 1,5mL. Foram adicionados etanol na proporção de 2X o volume do sobrenadante e 32 µl de NaCl 5M. Incubou-se a -20° C por 20 min. Centrifugou-se por 20 min e o precipitado foi lavado com etanol 70%.

Solução de lise:

0,05 M EDTA (pH 8),

0,3% SDS.

#### **3.5.5 Teste de marcas de auxotrofias (Guthrie e Fink, 1991)**

Este teste foi realizado para verificar a possibilidade de haver contaminantes após o processo de transformação de leveduras. As leveduras foram colocadas para crescer em placas seletivas para todos os aminoácidos pertinentes, a 30°C sem agitação. Após aproximadamente 72 horas, analisou-se o crescimento das leveduras nas diversas placas. O crescimento deve ocorrer somente onde a auxotrofia for complementada ou onde a levedura for originalmente prototrófica.

#### **3.5.6 Eletroforese de DNA em gel de agarose (Sambrook et al., 1989)**

A agarose (0.8% p/v) foi aquecida em TAE 1X no volume final desejado para o gel e acrescentou-se brometo de etídio em concentração final de 0.5 µl/ml. O gel foi polimerizado em temperatura ambiente e, para a corrida do DNA, aplicou-se uma voltagem de 1 a 5 V/cm<sup>2</sup>.

TAE 1X: Tris-acetato 0.04M, EDTA 0.001 M

### **3.5.7 Purificação de DNA em gel de agarose**

A purificação foi realizada segundo o protocolo do Kit PCR clean-up Gel extraction - NucleoSpin®Extract II (Macherey Nagel).

### **3.5.8 Precipitação de DNA (Sambrook et al., 1989, modificado)**

A solução de DNA deverá ter seu volume completado para 100 µl. Foram adicionados 1 µl de glicogênio para facilitar a visualização do sedimento final, 25 µl de acetato de amônio 10M (concentração final de 2.5M). A solução foi vortexada e foi adicionado 250 µl de etanol absoluto (2 volumes). A solução foi novamente vortexada e incubada em freezer a -20°C por pelo menos 24 horas. Em seguida foi centrifugada por 15 minutos a 14.400 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o ressuspendido no volume apropriado de H<sub>2</sub>O mili-Q.

### **3.5.9 Digestão de DNA com enzimas de restrição (Sambrook et al., 1989, modificado)**

Para cada µg de DNA a ser digerido foi adicionado 1 unidade de enzima de restrição, sendo que o volume de enzima não deve ultrapassar 10% do volume final da reação. Foi adicionado tampão apropriado para enzima utilizada na quantidade de 10% do volume final da reação de digestão e o volume final foi completado com H<sub>2</sub>O mili-Q estéril. Foi verificado que a eficiência da digestão era maior quando esta era realizada com concentração final de DNA igual ou inferior a 0.1µg/µl. A digestão foi colocada na temperatura apropriada para ação da enzima de restrição por um período de 3 a 5 horas.

### **3.5.10 Ligação de fragmentos de DNA (Sambrook et al., 1989, modificado)**

Para a ligação de fragmentos de DNA deve ser evitado que o volume final excedesse a 10µl. Foi adicionado 10ng do vetor em solução, 3x a quantidade do vetor em equivalente molar de inserto e H<sub>2</sub>O mili-Q. Foi adicionado o tampão da ligase (10% do volume final) e 1µl de ligase (T4 DNA ligase 5u/µl). Para ligações de fragmentos de DNA com pontas coesivas a ligação foi levada a 22°C por 16 horas.

### **3.5.11 Reação em cadeia da polimerase - PCR (Sambrook et al., 1989)**

Para reações em que o DNA molde era pequeno (cerca de 5Kb) foram utilizados 30ng de DNA. Nas reações em que o DNA molde era relativamente maior (acima de 10Kb), utilizou-se cerca de 100ng de DNA. Adicionou-se tampão de Taq DNA polimerase (50mM de

KCl, 10mM de Tris-HCl pH9, 0,1% de Triton X100 e 0,15mM de MgCl<sub>2</sub>) a 10% do volume final, 0,2mM de dNTP, 0,04U/μl de Taq DNA polimerase, 0,004U/μl de Vent DNA polimerase e 1.0μM de cada iniciador. A reação foi levada ao termociclador e uma alíquota de 5μl do produto final utilizada para análise em gel de agarose 0.8% com brometo de etídio

### 3.5.12 PCR de colônias

A colônia (bactéria ou levedura) utilizada foi retirada da placa seletiva com ponteira, sendo que esta foi levemente raspada em outra placa contendo meio seletivo. A ponteira foi utilizada para refluxo na reação de PCR previamente preparada, fornecendo assim o DNA molde. A placa seletiva foi incubada na temperatura apropriada e a reação foi levada ao termociclador. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 0.8% com brometo de etídio.

### 3.5.13 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento foi realizado utilizando-se cerca de 600 ng de DNA em solução, sendo que o volume de DNA e água da reação deve ser de 5μl. Trata-se de um grande quantidade de DNA, cerca de 3X mais do que é utilizado com produtos de PCR, mas devido ao grande tamanho do vetor sequenciado (10Kb), utilizaremos uma quantidade maior. Foram adicionados 1μl de um dos iniciadores (5μM/μl) e 4μl de DYEnamic ET<sup>®</sup> Terminator kit. A reação foi levada a um termociclador e aplicada no aparelho MegaBACE 1000<sup>®</sup> Amersham-Biosciences-GE.

### 3.5.14 Ensaio de sensibilidade ao Metilmetanosulfonato (MMS) (Collavoli et al., 2008)

As células foram cultivadas em meio sintético sem Uracila (SD –Ura) até atingirem a fase exponencial de crescimento ( $1-2 \times 10^7$  cels/ml). Em seguida as células foram centrifugadas e lavadas e ressuspensas em solução salina. Para avaliar o porcentagem de sobreviventes, células do tipo selvagem e mutantes expressando *RAD51* nativo ou *radA* de *H. salinarum* foram incubadas, no escuro, por 24 horas em SD-URA com 0,2 % e 2% de galactose, na ausência e na presença de diferentes concentrações de MMS (0;12,5; 25 e 50 μg/ml). Depois disso, as células foram lavadas, contadas e plaqueadas em número apropriado em placas contendo meio YPAD. As placas foram incubadas a 30°C durante 3 a 4 dias. As colônias foram contadas e as porcentagens de sobrevivência foram calculadas.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análises *in silico* evidenciaram a conservação estrutural das proteínas RadA de *Halobacterium salinarum* e Rad51 de *Saccharomyces cerevisiae*

Análises *in silico* se baseiam no pressuposto que os organismos apresentam origem comum, e desta forma podemos observar similaridades ao compararmos seqüências e estruturas. Quanto mais próximos os organismos evolutivamente, menos divergentes devem ser seus genes e proteínas. Este tipo de abordagem pode nos indicar a possibilidade de funcionalidade cruzada entre organismos filogeneticamente distantes, assim como indicar funcionalidade sistêmica como um todo, a depender do sistema em questão. Em nosso estudo realizamos inicialmente uma análise comparativa *in silico* entre a proteína RadA de *H. salinarum* e Rad51 de *S. cerevisiae*, na busca de similaridades estruturais que nos subsidiassem e nos orientassem no planejamento experimental posterior.

Análises de similaridade em relação à seqüência de aminoácidos das proteínas RadA de *H. salinarum* e Rad51 de *S. cerevisiae*, evidenciaram uma baixa identidade (35%) e similaridade moderada (54%) entre estas proteínas.

Análises de proximidade entre as proteínas *HbsRadA* (RadA de *H. salinarum*), *ScRad51* (Rad51 de *S. cerevisiae*) e *EcRecA* (RecA de *Escherichia coli*), utilizando a seqüência de aminoácidos destas proteínas, mostraram uma similaridade maior entre *HbsRadA* e *ScRad51* (figura 1). Inserir alinhamento das três proteínas

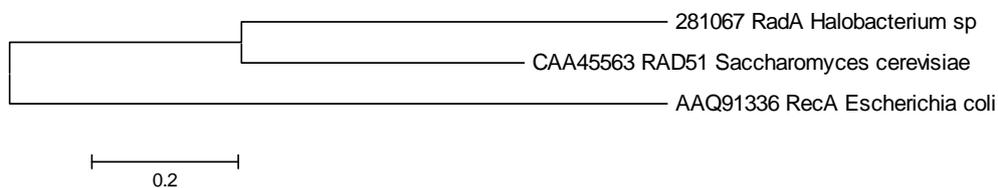


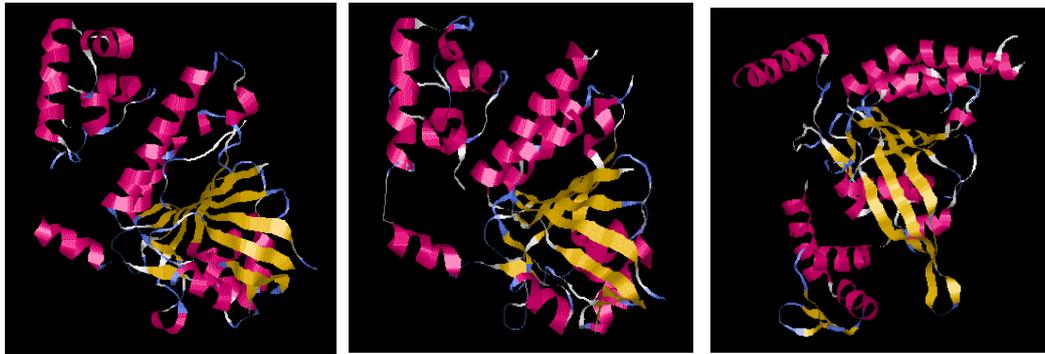
Figura 1. Árvore de proximidade envolvendo as três representantes da família de recombinases RecA/Rad51/RadA. A topologia da árvore foi gerada pelo método *Neighbour-joining* (Programa MEGA3).

Ao constatarmos uma similaridade moderada na seqüência linear de RadA e Rad51, partimos para um abordagem estrutural, pois diversos dados mostram que a estrutura terciária é a configuração protéica mais conservada entre duas proteínas homólogas. Desta forma

modelamos a proteína RadA de *H. salinarum* por homologia, com o auxílio do programa SWISS-MODEL (Guex et al., 1997; Schwede et al., 2003; Arnold et al., 2006), com o intuito de verificarmos a configuração espacial como um todo, assim como a configuração espacial de regiões importantes tanto para atividade enzimática em si, como regiões de interação com outras proteínas do sistema.

Durante o processo de modelagem utilizamos como molde a proteína RadA de *Pyrococcus furiosus*. Os resultados mostraram que apesar da baixa homologia de seqüência, a estrutura terciária da proteína RadA mostrou-se muito semelhante a estrutura terciária da proteína Rad51, o que nos deu o primeiro indício de possibilidade de complementação funcional entre estas proteínas. Em contrapartida RecA de *E. coli* apresentou diferenças estruturais marcantes em relação RadA e Rad51, como o domínio N-terminal bastante reduzido (figura 2).

Estas diferenças na estrutura entre RecA e Rad51 podem ser a razão da falta de complementação funcional por RecA de *E. coli* quando expressa em linhagens de *S. cerevisiae* mutantes *rad51* (Morais et al., 1998).



RadA – *H. salinarum* (modelada)

Rad51 – *S. cerevisiae*

RecA – *E. coli*

Figura 2. Modelo tridimensional de RadA de *H. salinarum* produzido pelo programa Swiss-Model usando a estrutura da proteína RadA de *Pyrococcus furiosus* cristalizada como molde comparada com as estruturas das proteínas Rad51 de *S. cerevisiae* e RecA de *E. coli* cristalizadas.

Krejci e colaboradores, em 2001, analisaram pontos importantes para interação protéica entre Rad51 de *S. cerevisiae* e outras proteínas envolvidas no sistema de reparo, tais como: Rad52, Rad54 e Rad55. Neste trabalho foram identificadas diversas regiões que quando mutadas afetavam a interação de rad51 com estas outras proteínas. Baseando-se neste estudo, alinhamos a seqüência linear de RadA com Rad51, no intuito de verificar se dentre a baixa conservação observada estavam resíduos importantes na interação com outras proteínas

do sistema. Observamos que apesar dessa baixa similaridade, podemos encontrar em RadA resíduos importantes na interação com as outras proteínas do sistema de reparo de levedura, estando parte destes resíduos localizados no N-terminal (figura 3).

```

Yeast MSQVQEQHIS ESQLQYGNS LMSTVPADLS QSVVDGNGNG SSEDIEATNG SGDGGGLQEQ
Halo -----
Yeast AEAQGEMEDE AYDEAALGSF VPIEKLVNG ITMADVKKR ESLLHTAEAV AYAPRKDLE
Halo -----M RGAPPTRRYI SESDLEDLPG VGPPTEKR DSCFDAFQIL TVANSAELSN
Yeast IKGISEAKAD KLLNEAARLV PMG-FVTTAAD FHMRRSELIC LTTGSKNLDL LLGGGVETGS
Halo TADIGESTAA DVIQAAREAA DVGGFEGAT VLEPREQIGK LTWNIPEVDD LLGGGVETQS
Yeast ITELFGEFRT GKSQLCHTLA VTCQIPLDIG GGEGKCLYID TEGTFRPVRL VSIAQRFGLD
Halo ITEVYGEFFGA GKSQVTHQLA VNVQLPTEYG ALHGRAVFID SEDTFRPERI DDMVRGLSDE
Yeast ----- PDDALN NVAYARAYNA DHQLRLLDAA AQMMSESR--
Halo TLQAAMEAHE IEGSTDEDEDT LTELVDAFLD KIHVAKGFNS NHQMLLAEKA KEIASEHEDG
Yeast ---FSLIVVD SVMALYRTDF SGRGELSARQ MHLAKFMRAL QRLADQFGVA VVVTNQVVAQ
Halo DWPVRMLTVD SLTAHFRAEY VGRGELADRQ QKLNKHLHD EPVGDLYNAA VLVTNQVQSN
Yeast VDGGMAFNPD PKKPIGGNIM AHSSTTRLGF KKGKGCQRLC KVVDSPLPE AECVFAIYED
Halo PD---AFFGD PTKPIGGNIL GHKSTFRMYL RKSKNDKRIV KLVDAPNLAD GEAVMRVQDE
Yeast GVGDPREDE
Halo GLKPE-----

```

Figura 3. Alinhamento das seqüências das proteínas *ScRad51* (Krejci et al., 2001) e *HbRadA*, indicando as regiões críticas para interação com *ScRad51p*, *ScRad52p* e *ScRad54p* e a homologia dessas regiões. Azul e vermelho: Resíduo de aminoácido importante para interação com Rad54 ou Rad52, amarelo: Resíduo de aminoácido importante para interação com Rad54 e Rad52, verde: Resíduo de aminoácido importante para a associação *ScRad51*-Rad54, assim como para *ScRad51*-Rad55, cinza: Resíduo de aminoácido importante para interação entre *ScRad51*.

Posteriormente alinhamos a estrutura terciária destas proteínas para observarmos se estes pontos de interação estariam em posição similar na estrutura, possibilitando assim a interação desejada. Os dados mostraram que além de estarem presentes na seqüência linear de RadA também se dispunham de forma semelhante na configuração terciária (figura 4).

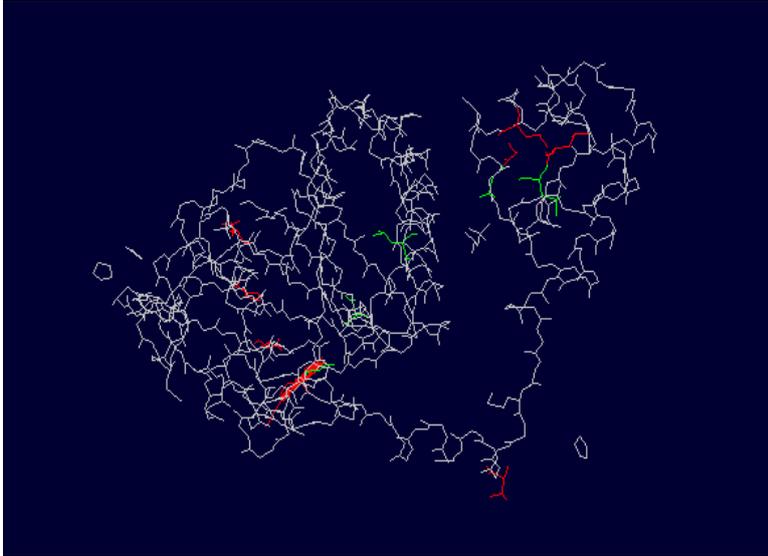


Figura 4. Alinhamento tridimensional de *HbsRadA* (modelada a partir de *PjRadA*) e *ScRad51* mostrando a conservação da localização de resíduos importantes para a interação com proteínas do complexo *ScRad51* (em vermelho e verde) em *HbsRadA*.

Visto que estas proteínas apresentam similaridades em características importantes para o funcionamento correto no sistema de reparo por recombinação homóloga de *S. cerevisiae*, o gene *radA* apresentou uma grande possibilidade de complementação funcional do mutante *rad51*. Embora haja diferenças entre a frequência de utilização de códons para síntese dessas proteínas em *H. salinarum* e *S. cerevisiae*, a expressão de *radA* em *S. cerevisiae* deve acontecer, uma vez que esta sintetiza todos os tRNAs necessários, e em quantidade suficiente, para a expressão correta de *radA*.

Embora os organismos *S. cerevisiae* e *H. salinarum* vivam em condições muito distintas, *S. cerevisiae* tolera concentrações de sal até 1,1 M e *H. salinarum* sobreviva a concentrações de sal acima de 4,4M de NaCl, indicando concentrações iônicas intracelulares diferentes, as proteínas RadA e Rad51 apresentaram PI muito semelhantes de 4,36 e 4,64, respectivamente. Esses dados sugerem que RadA não teria problemas em relação à conformação estrutural ao ser expressa em células de *S. cerevisiae*.

Uma vez que a análise *in silico* mostrou a grande semelhança estrutural entre Rad51 e RadA passamos a verificar se a expressão de RadA em leveduras complementaria a deficiência em Rad51 *in vivo*.

## 4.2 Estudos de complementação funcional de *rad51* de *Saccharomyces cerevisiae* por *radA* de *Halobacterium salinarum* *in vivo*

### 4.2.1 Clonagem de *radA* de *Halobacterium salinarum* e *RAD51* de *Saccharomyces cerevisiae* em vetor bacteriano

O gene *radA* foi amplificado por PCR utilizando como molde o DNA extraído (Material e Métodos, item 3.5.4.2) das linhagens ATCC 19700, ATCC 33171 e ATCC43214. Apesar da obtenção de ampliações de tamanhos esperados utilizando o DNA das três linhagens de *H. salinarum* disponíveis em nosso laboratório como molde para a reação de PCR (figura 5), continuamos o trabalho utilizando a linhagem ATCC 19700. Para a amplificação do gene *rad51* de *S. cerevisiae* (figura 6) utilizamos a linhagem S288c, já totalmente seqüenciada.

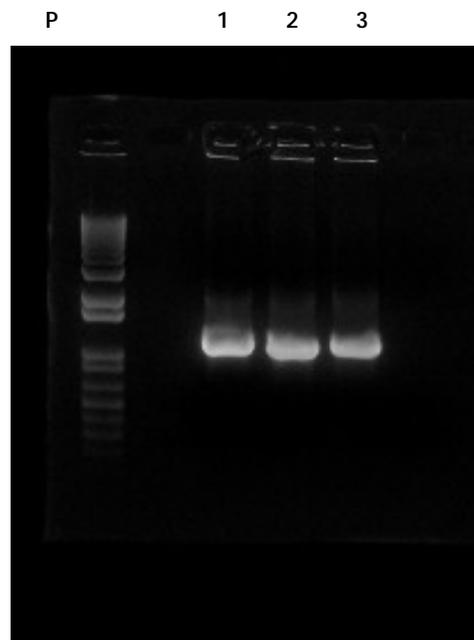


Figura 5. Amplificação do gene *radA* de *Halobacterium salinarum* (linhagens ATCC 19700, ATCC 33171, ATCC 43214) por PCR. P: Padrão de peso molecular 1Kb plus, 1: Amplificação de aproximadamente 1.2 Kb correspondente ao gene *radA* da linhagem de *H. salinarum* ATCC 19700, 2: Amplificação de aproximadamente 1.2 Kb correspondente ao gene *radA* da linhagem de *H. salinarum* ATCC 33171, 3: Amplificação de aproximadamente 1.2 Kb correspondente ao gene *radA* da linhagem de *H. salinarum* ATCC 43214.

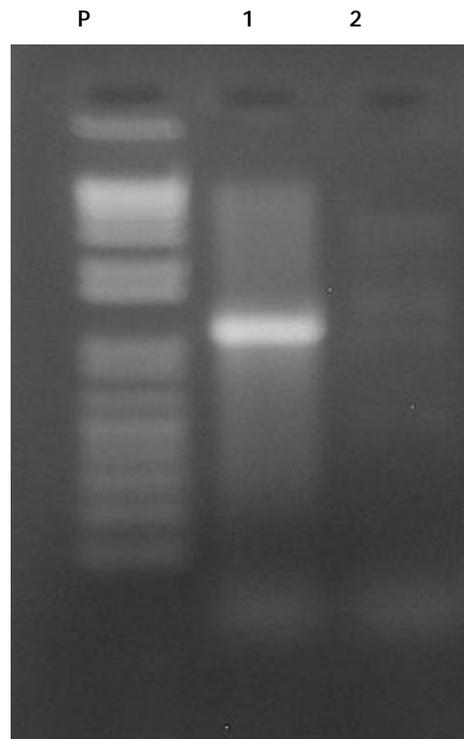


Figura 6. Amplificação do gene *RAD51* de *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem S288c) por PCR. . P: Padrão de peso molecular 1Kb plus, 1: Amplificação de aproximadamente 1.2 Kb correspondente ao gene *RAD51*, 2: Controle negativo.

Os produtos de amplificação correspondentes aos genes *radA* e *RAD51* foram inseridos no vetor pGemT (Invitrogen). A presença dos genes no vetor de clonagem foi confirmada por PCR de colônias (Figuras 7 e 8). Quatro transformantes de cada clonagem foram selecionados e foram seqüenciados. A busca em bancos de dados mostrou que seqüências obtidas correspondiam aos genes *radA* de *Halobacterium salinarum* e *rad51* de *Saccharomyces cerevisiae* (acima de 99% de identidade).

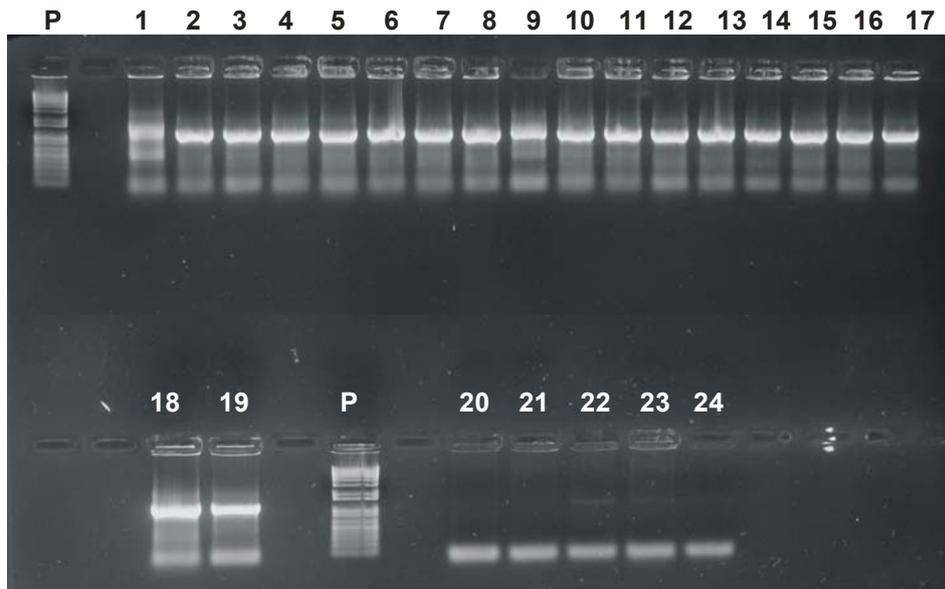


Figura 7. PCR de colônias de transformantes DH5 $\alpha$ -pGEMT-*rada* (ATCC19700). P padrão de peso molecular 1KbPlus, 1 – 19 clones positivos (brancos), 20 ao 24 clones negativos (azuis).

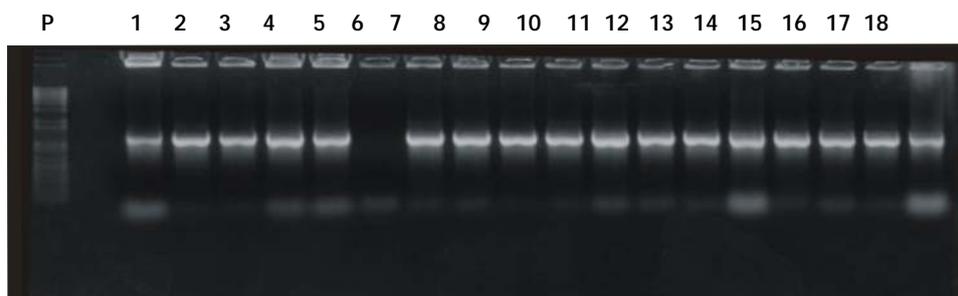


Figura 8. PCR de colônias de transformantes DH5 $\alpha$ -pGEMT-*RAD51* (S288C). P padrão de peso molecular 1Kb Plus, 1 – 5 e 7 – 18 clones positivos (brancos), 6 clone negativo(azul).

#### 4.2.2 Clonagem de *rada* de *Halobacterium salinarum* e *RAD51* de *Saccharomyces cerevisiae* em vetor bifuncional para expressão em leveduras

Os plasmídios pGEMT-*RAD51* e pGEMT-*rada* foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *XbaI* para a obtenção dos fragmentos de DNA com extremidades coesivas contendo os genes *rada* e *RAD51*. Os fragmentos de DNA contendo os genes *rada* e *RAD51* foram inseridos em pYES2 (vetor bifuncional com promotor *PGALI*- indutível por galactose) previamente digerido com as mesmas enzimas. Após a clonagem foi realizado PCR de

colônias (Materiais e Métodos, item 3.5.12) para selecionar os clones positivos para a presença do gene no vetor de expressão (figura 9).

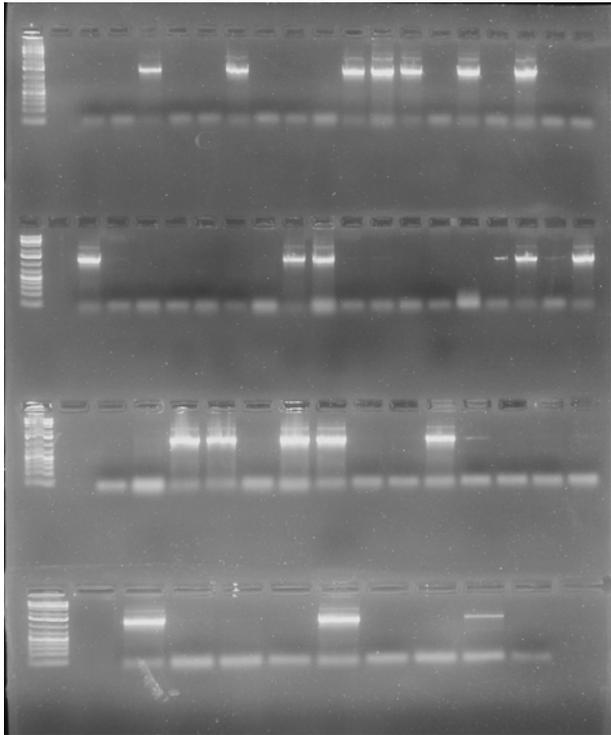


Figura 9. PCR de colônias de transformantes DH5 $\alpha$ -pYES2-*RAD51*(S288C). P padrão de peso molecular 1Kb Plus.

#### 4.2.3 A expressão de *radA* de *Halobacterium salinarum* em *Saccharomyces cerevisiae* e avaliação da capacidade de complementação de *rad51*

As linhagens de *S. cerevisiae* isogênicas F3 (mutante *rad51*) e F808 (selvagem para o gene *rad51*), foram transformadas com os plasmídios pYES2 (vetor – controle negativo), pYES::*radA*, pYES2::*RAD51* (controle positivo). Os transformantes foram testados quanto à sensibilidade ao metilmetanosulfonato (MMS) com a indução da expressão dos genes pelo acréscimo de 0,2% de galactose ao meio de cultura (Material e Métodos, item 3.5.14).

A principal lesão de DNA produzida por MMS é a metilação, produzindo principalmente 3-metiladenina (3MeA). As formações 3MeA são reparadas principalmente por Reparo por excisão de base (BER), mas algumas lesões podem ser convertidas a duplas quebras no DNA (DSBs), as quais são reparadas por junção de extremidades não homólogas

(NHEJ) ou recombinação homóloga (HR) (Chlebowicz e Jachymczyk, 1979; Beranek, 1990; Kupiec, 2000; Lewis e Resnick, 2000). Recentemente, tem sido mostrado que MMS não induz duplas quebras no DNA em leveduras e células de mamífero (Lundin et al., 2005). O número de sítios alquilados que são convertidos de simples quebra para quebra duplas relatados em seus ensaios eram poucos, porém, o bastante para requerer o envolvimento da via de reparo de DSB. Os autores também sugeriram que dano de alquilação possa protelar a forquilha de replicação, conduzindo à formação de uma estrutura tipo pé de galinha, que se assemelha a uma junção de Holliday (Lundin et al., 2005). Isto pode explicar por que os mutantes no reparo de DSB que também são deficientes em recombinação são sensíveis ao MMS (Lundin et al., 2005).

A uma concentração de 25µg/mL de MMS (figura 10) a linhagem de *S. cerevisiae* mutante *rad51* expressando *radA* apresentou uma porcentagem de sobrevivência de 9.9%. Assim foi aproximadamente 6,6 vezes mais resistente que a linhagem mutante contendo apenas pYES2 (controle negativo) nas mesmas condições (figura 10). A linhagem selvagem e a linhagem mutante expressando pYES2::*RAD51* apresentaram porcentagens de sobrevivência muito próximas, 29,2% e 29,6% respectivamente, o que representa a sobrevivência de cerca de 20 vezes a da linhagem mutante (figura 10). A figura 10 mostra também os resultados obtidos com 50µg/mL de MMS em células com expressão induzida por 0,2% de galactose. Também nessas condições verifica-se a complementação funcional parcial de linhagem de *S. cerevisiae* mutante *rad51* por expressão de *radA* de *H. salinarum*, uma vez que a sobrevivência foi superior à da linhagem mutante. A porcentagem de sobrevivência da linhagem mutante *rad51* foi 0.01%, em contrapartida, a da linhagem mutante *rad51* expressando *rada* de *H. salinarum*, próxima de 1%, portanto aproximadamente 100 vezes maior.

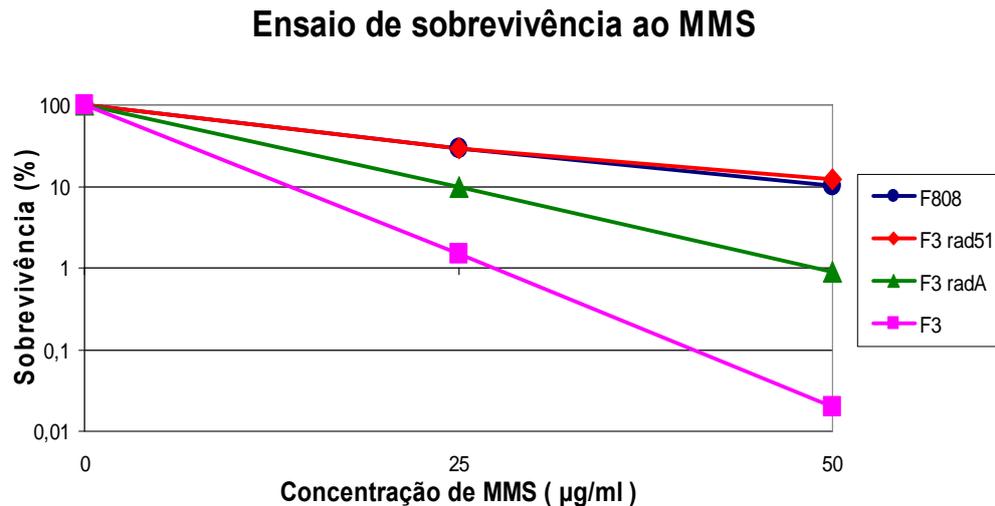


Figura 10. Ensaio de sobrevivência ao MMS. F3: Linhagem mutante em *rad51* transformada apenas com o plasmídeo pYES2, F3*radA*: Linhagem mutante em *rad51* transformada com o plasmídeo pYES::*radA*, F3*rad51*: Linhagem mutante em *rad51* transformada com o plasmídeo pYES2::*RAD51*, F808: Linhagem selvagem para o gene *RAD51*. A expressão dos genes foi induzida com 0,2% de galactose.

Em trabalho realizado por Rashid e colaboradores em 1996, a proteína RadB de *Pyrococcus sp.* foi capaz de complementar linhagem de *E. coli* mutante em *recA*. Em 2001, Inwood e colaboradores evidenciaram que a complementação tratava-se de artefato produzido por super-expressão da proteína RadB. Para demonstrar a hipótese eles utilizaram o mesmo sistema e super-expressaram a proteína glutamato desidrogenase, que não está relacionada com o reparo de DNA em *E. coli*. O resultado mostrou que tanto a proteína RadB, quanto a glutamato desidrogenase, complementavam a mutação em *recA* quando super-expressas em *E. coli*.

A complementação parcial observada neste trabalho não parece estar relacionada à super-expressão inespecífica de um gene, uma vez que não foi observada complementação funcional quando *radA* de *H. salinarum* foi expresso em linhagem de *S. cerevisiae* mutante *rad52*, sendo que as porcentagens de sobrevivência da linhagem mutante *rad52* e esta mesma linhagem expressando *radA* não mostraram diferenças significativas (dados não mostrados). Entretanto, a expressão de uma proteína controle, que não esteja associada ao sistema de reparo de DNA, poderá ser realizada para a comprovação da complementação parcial específica de linhagem de *S. cerevisiae* mutante *rad51* por expressão de *radA* de *H. salinarum*.

Nesses ensaios iniciais de sobrevivência ao MMS foram utilizadas as concentrações de 25µg/mL e 50µg/mL, as quais reduziram drasticamente a sobrevivência das leveduras, não nos permitindo avaliar se haveria diferença entre a sobrevivência da linhagem de levedura selvagem e da mutante expressando o *RAD51* nativo.

Novos ensaios foram então realizados utilizando-se as concentrações de MMS de 12,5µg/mL e 25µg/mL, nas mesmas condições de indução de expressão. Estes ensaios evidenciaram a diferença entre a sobrevivência da linhagem selvagem e a linhagem mutante expressando *RAD51* nativo, sendo observadas as porcentagens de sobrevivência de 73,5% e 44,4% a 12,5µg/mL de MMS, respectivamente (figura 11). Em relação à complementação de *rad51* por *radA*, houve um aumento de aproximadamente duas vezes na porcentagem de sobrevivência a 12,5µg/mL de MMS das leveduras expressando *radA*.

Em estudo anterior realizado por Shalguev e colaboradores (2004) a indução da expressão do gene *RAD51* da levedura *Pichia angusta* com 0,2% de galactose (vetor PYES2 - *PGALI*) foi capaz de complementar apenas parcialmente linhagens de *S. cerevisiae* mutantes *rad51*. A linhagem de *S. cerevisiae* mutante *rad51* expressando o gene *RAD51* de *P. angusta* foi 10 vezes mais resistente a 25 kilorads de radiação ionizante.

Em nosso estudo utilizamos MMS como agente indutor de duplas quebras no DNA, Salguev e colaboradores (2004), utilizaram Radiação ionizante. Estes agentes agem de forma diferente na produção de duplas quebras no DNA e não nos é possível comparar os dois trabalhos em relação à porcentagem de sobrevivência e a capacidade de complementação funcional de linhagens mutantes *rad51* por expressão de *RAD51* da levedura *Pichia angusta* e por *radA* da arqueia *H. salinarum*. O fato é que proteínas de organismos próximos, como as leveduras *S. cerevisiae* e *Pichia angusta*, mostraram complementação funcional parcial. Em nosso trabalho, obtivemos complementação funcional parcial de proteínas pertencentes a organismos muito distantes filogeneticamente, de domínios diferentes, indicando a relevância deste estudo para o entendimento da conservação de proteínas ao longo da evolução dos organismos.

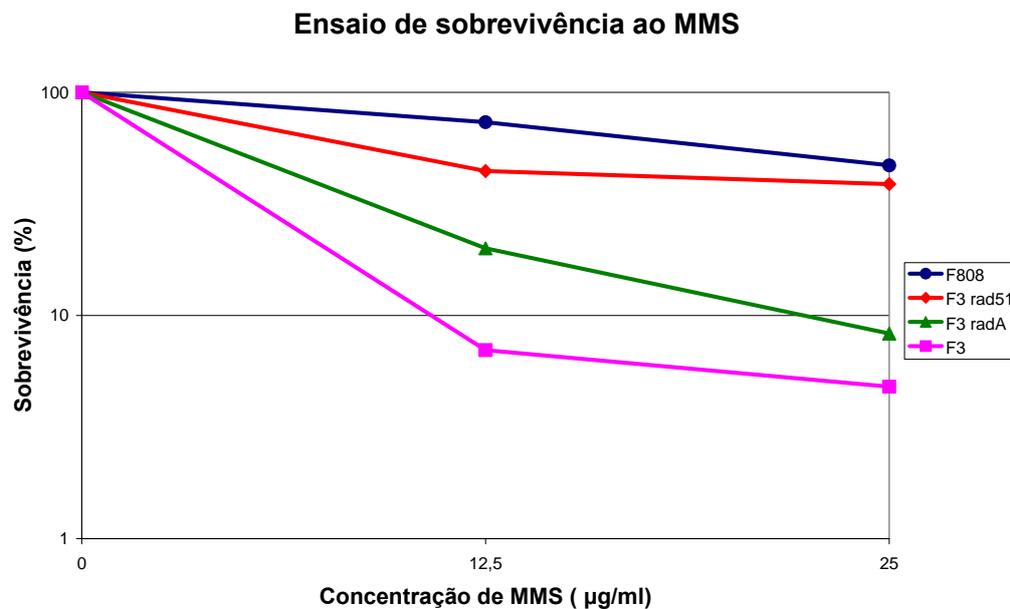


Figura 11. Ensaio de sobrevivência ao MMS. F3: Linhagem mutante em *rad51* transformada apenas com o plasmídeo pYES2, F3*radA*: Linhagem mutante em *rad51* transformada com o plasmídeo pYES::*radA*, F3*rad51*: Linhagem mutante em *rad51* transformada com o plasmídeo pYES2::*RAD51*, F808: Linhagem selvagem para o gene *RAD51*. A expressão dos genes foi induzida com 0,2% de galactose.

Para avaliar se o aumento da expressão de *radA* de *H. salinarum* em linhagem de *S. cerevisiae* mutante *rad51* modificaria a porcentagem de sobrevivência desta leveduras nós realizamos ensaios de sobrevivência ao MMS utilizando 10 vezes mais galactose (2%). A super-expressão de *radA* em linhagens de *S. cerevisiae* mutantes em *rad51* e *rad52* não levou a diferença significativa na sobrevivência das leveduras. Como visto em ensaio realizado anteriormente, onde a indução da expressão de *radA* em mutantes *rad52* foi realizado com a concentração de 0,2% de galactose, *radA* foi incapaz de complementar *rad52* mesmo sendo super-expresso (dados não mostrados). A super-expressão não alterou a complementação funcional parcial de *rad51* por *radA* (dados não mostrados). Estes dados suportam a conclusão que a complementação de *rad51* por *radA* é específica.

## 5. CONCLUSÕES

A proteína RadA de *H. salinarum* apresentou pouca similaridade em relação à seqüência primária de aminoácidos à proteína Rad51 de *S. cerevisiae*, contudo, ao realizarmos a modelagem de RadA e compararmos á estrutura cristalizada da proteína Rad51, foi possível evidenciar grande similaridade estrutural entre estas proteínas.

A semelhança estrutural, principalmente em pontos críticos, combinada com proximidade de PI das duas proteínas e a capacidade de *S. cerevisiae* sintetizar todos os tRNAs para todos os códons em quantidade suficiente, suportaram a realização de experimentos *in vivo* que testassem a capacidade de complementação de rad51 pela expressão de radA.

Os resíduos de aminoácidos críticos para a interação de Rad51 com ela mesma e com as proteínas que fazem parte do complexo que atua no reparo de DNA por recombinação homóloga encontram-se conservados em relação à disposição na estrutura tridimensional da proteína RadA de *H. salinarum*. Este fato sugere que RadA seria capaz de interagir com as outras proteínas do complexo que atuam no reparo de DNA por recombinação homóloga.

Nos estudos *in vivo*, nossos dados indicam que RadA de *H. salinarum* é capaz de complementar funcionalmente a deficiência de Rad51 em *S. cerevisiae*, ao menos parcialmente.

## 6. PERSPECTIVAS

Nossos estudos lançaram luz sobre um aspecto pouco estudado em se tratando de homologia e conservação de proteínas, a conservação de sua estrutura tridimensional. A busca por similaridade e proximidade entre proteínas, utiliza programas que apenas levam em consideração as seqüências lineares das proteínas estudadas. Faz-se necessário o desenvolvimento de ferramentas de estudos *in silico* que propiciem uma comparação, senão da estrutura terciária das proteínas, pelo menos da estrutura secundária destas.

A complementação parcial de uma proteína do domínio *Eukarya* por outra do domínio *Archaea in vivo*, é um dado novo e significativo e que precisa ser confirmado por estudos mais refinados para dar mais consistência ao nosso trabalho.

Os estudos que serão realizados incluem:

- Verificar os níveis de expressão da proteína RadA de *H. salinarum* em *S. cerevisiae* por meio de Western blot.
- Expressar *radA* de *H. salinarum* em linhagens de *S. cerevisiae* mutantes *rad51* em concentrações crescentes de NaCl para verificar se há aumento no nível de complementação funcional entre as proteínas.
- Dados preliminares indicam que *radA* de *H. salinarum* não complementa a deficiência de *rad52* em *S. cerevisiae*. Novos ensaios serão realizados com o intuito de reforçar essa hipótese.
- Para testar a conservação das recombinases RecA/Rad51/RadA nos três domínios, expressaremos o gene *radA* de *H. salinarum* em *E. coli* para realizarmos estudos de complementação *in vivo*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allers T, Mevarech M (2005). Archaeal genetics-the third way. *Nature Reviews Genetics*.6: 58-730

Anderson DG, Kowalczykowski SC (1997). The translocating RecBCD enzima stimulates recombination by directing RecA protein onto ssDNA in a chi-regulated manner. *Cell*. 90: 77-86.

Anderson DG, Kowalczykowski SC (1997). The recombination hot spot chi is a regulatory element that switches the polarity of DNA degradation by the RecBCD enzyme. *Genes Dev*. 11: 571-81

Ariza A, Richard DJ, White MF, Bond CS (2005). Conformational flexibility revealed by the crystal structure of a crenarchaeal RadA *Nucleic Acids Research*. 33: 1465–1473

Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22,195-201.

Beernink HT, Morrical SW (1999). RMPs: recombination/replication mediator proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 24, 385-389.

Beranek DT (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res*. 231:11-30. Review.

Bianco PR, Kowalczykowski SC (2000). Translocation step size and Mechanism of the RecBC DNA helicase. *Nature*. 405: 368-372.

Boubriak I, Ng WL, DasSarma P, DasSarma S, Crowley DJ and McCready SJ (2008) Transcriptional responses to biologically relevant doses of UV-B radiation in the model archaeon, *Halobacterium* sp. NRC-1. *Saline Systems*. 4: 13

Brown JR, Doolittle WF (1997). Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61: 456-502.

Burma S, Chen BPC, Chen DJ(2006) Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA repair*. 5: 1042–1048

Chlebowicz E, Jachymczyk WJ(1979). Repair of MMS-induced DNA double-strand breaks in haploid cells of *Saccharomyces cerevisiae*, which requires the presence of a duplicate genome. *Mol Gen Genet*. 167:279-86.

Costanzo MC, Hogan JD, Cusick ME, Davis BP, Fancher AM, Hodges PE, Kondu P, Lengieza C, Lew-Smith JE, Lingner C, Roberg-Perez KJ, Tillberg M, Brooks JE and Garrels JI (2000) The Yeast Proteome Database (YPD) and *Caenorhabditis elegans* Proteome Database (WormPD): comprehensive resources for the organization and comparison of model organism protein information. *Nucleic Acids Res* 1:73-76.

Collavoli A, Comelli L, Rainaldi G and Galli A (2008)A yeast-based genetic screening to identify human proteins that increase homologous recombination. *FEMS Yeast Res*. 8:351-61.

Courcelle J, Ganesan AK, Hanawalt PC (2001). Therefore, what are recombination proteins there for? *Bioessays*. 23: 375-384.

Cox MM (2003). The bacterial RecA protein as a motor protein. *Annu. Rev. Microbiol*. 57: 551.

Cox MM (1999). Recombinational DNA repair in bacteria and the RecA protein. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 63:311-66. Review.

De Vries J, Wackernagel W (1992). Recombination and UV resistance of *Escherichia coli* with the cloned *recA* and *recBCD* genes of *Serratia marcescens* and *Proteus mirabilis*: evidence for an advantage of interspecies combination of *P. mirabilis* RecA protein and RecBCD enzyme. *J. Gen. Microbiol*. 138: 31-38.

DiRuggiero J, Brown JR, Bogert AP, and Robb FT (1999). DNA repair systems in archaea: mementos from the last universal common ancestor? *J. Mol. Evol*. 49: 474-484.

Dolinski K, Balakrishnan R, Christie KR, Costanzo MC, Dwight SS, Engel SR, Fisk DG, Hirschman JE, Hong EL, Issel-Tarver L, Sethuraman A, Theesfeld CL, Binkley G, Lane C, Schroeder M, Dong S, Weng S, AndRada R, Botstein D and Cherry JM (2002). Saccharomyces Genome Database. <http://www.yeastgenome.org>.

Egelman EH, Stasiak A (1986). Structure of helical RecA- DNA complexes. Complexes formed in the presence of ATP-gamma-S or ATP. *J Mol Biol.* 191: 677-697

Friedberg EC, Walker GC, Siede W (1995). DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington.

Friedberg EC (2003). DNA damage and repair. *Nature* 421:436-440.

Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL, Fink GR (1999). The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 96: 1480-1485.

Gietz, R. D., Schiestl, R. H. (1995). Transforming yeast with DNA. *Methods in Molecular and Cellular Biology.* 5: 255-269.

Goodman MF (2002) Error- prone DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem.* 71: 17-50

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel J D, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996). Life with 6000 genes. *Science.* 274: 546

Grogan DW (2000). The question of DNA repair in hyperthermophilic archaea. *Trends Microbiol.* 8: 180-185.

Guex N, Peitsch MC (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723.

Gupta RC, Golub E, Bi B, Radding CM (2001). The synaptic activity of HsDmc1, a human recombination protein specific to meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.,* 98: 8433

Guthrie C, Fink GR (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology*. 194.

Haber JE (2000). Partners and Pathways repairing a double-strand breaks. *Trends Genet*. 16: 259-264.

Haber JE (2000). Recombination a frank view of exchanges and vice versa (2000) *Curr Opin Cell Biol*. 12: 286-292.

Harmon FG, Kow SC (1998). RecQ helicase, in concert with RecA and SSB proteins, initiates and disrupts DNA recombination. *Genes Dev*. 12: 1134-1144.

Huber H, Hohn MJ, Rachel R, Fuchs T, Wimmer VC, Stetter KO (2002). A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417: 27-28.

Inwood W, Kane S, DiRuggiero J, Roob F, Clark AJ (2001). The RadB protein from *Pyrococcus* does not complement *E. coli* RecA mutations in vivo. *Mol Genetics Genomic* .265: 683-686 .

Keeney S, Girouz CN, Kleckner N (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of widely conserved protein family. *Cell*. 88: 375-384.

Kil YV, Baitin D M, Masui R, Bonch-Osmolovskaya EA, Kuramitsu S and Lanzov VA. (2000). Efficient strand transfer by the RadA recombinase from the hyperthermophilic archaeon *Desulfurococcus amylolyticus*. *J. Bacteriol*. 182: 130-134.

Kim MW, Kim EJ, Kim JY, Park JS, Oh DB, Shimma Y, Chiba Y, Jigami Y, Rhee SK, Kang HA (2006). Functional characterization of the *Hansenula polymorpha* HOC1, OCH1, and OCR1 genes as members of the yeast OCH1 mannosyltransferase family involved in protein glycosylation. *J Biol Chem*. 281:6261-72.

Komori K., Miyata T, DiRuggiero J, Holley-Shanks R, Hayashi I, Cann I K, Mayanagi K, Shinagawa H and Ishino Y (2000). Both RadA and RadB Are Involved in Homologous Recombination in *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem*. 275: 33782-33790

Kowalczykowski SC, Dixon DA, Eggleston AK, Lauder SD, Rehrauer WM (1994). Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 58: 401-465.

Kowalczykowski SC, Krupp RA (1987). Effects of *Escherichia coli* SSB protein on the single-strand DNA-dependent ATPase activity of *Escherichia coli* RecA protein. Evidence that SSB protein facilitates the binding of RecA protein to regions of secondary structure within single-strand DNA (1987). *J Mol Biol.* 193: 97-113.

Kuzminov A (1999). Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage  $\lambda$ . *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63: 751-813.

Kupiec M (2000). Damage-induced recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res.* 2000. 451:91-105. Review.

Lewis LK, Resnick M (2000). Tying up loose ends: nonhomologous end-joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res.* 451:71-89

Lilley DM, White MF (2000). Resolving the relationships of resolving enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 9351-9353

Lundin C, North M, Erixon K, Walters K, Jenssen D, Goldman AS, Helleday T (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 33:3799-811.

McGrew DA and Knight KL (2003). Molecular design and functional organization of the RecA protein. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38: 385-432.

Marmorstein LY, Ouchi T, Bronson SA (1998). The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:13869-13874.

Mewes HW, Heumann K, Kaps A, Mayer K, Pfeiffer F, Stocker S and Frishman D (1999). MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Res.* 27:44-48

Mewes HW, Frishman D, Gruber C, Geier B, Haase D, Kaps A, Lemcke K, Mannhaupt G, Pfeiffer F, Schüller C, Stocker S and Weil B (2000). MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Res* 28:37-40.

Modrich P, Lahue, R (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.*65: 101

Moore RL, MaCarthy B J (1969). Characterization of the deoxyribonucleic acid of various strains of halophilic bacteria. *J Bacteriol.* 99: 248-254.

Morais Jr. MA, Vlcková V, Fridrichová I, Slaninová M, Brozmanová J, Henriques JAP (1998). Effect of bacterial RecA expression on DNA repair in the Rad51 and *rad52* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics and Molecular Biology.* 21: 3-9.

Ng WV, Kennedy SP, Mahairas GG, Berquist B, Pan M, Shukla HD, Lasky SR, Baliga NS, Thorsson V, Sbrogna J, Swartzell S, Weir D, Hall J, Dahi TA, Welti R, Goo YA, Leithauser B, Keller K, Cruz R, Danson MJ, Hough DW, Maddocks DG, Jablonski PE, Krebs M, Angevin CM, Dale H, Isenbarger TA, Peck RF, Pohlschroder M, Spudich JL, Jung K, Alam M, Freitas T, Hou S, Daniel CJ, Dennis PP, Omer AD, Ebhardt H, Lowe TM, Liang P, Riley M, Hood L, DasSarma S (2000). Genome Sequence of Halobacterium species NRC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 97: 12176-12181.

Ogawa T, Yu X.; Shinohara A; Egelman E H (1993). Similarity of the yeast Rad51 filament to the bacterial RecA filament. *Science.* 259: 1896-1899.

Oren A (1999). Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*63: 334-348.

Pâques F, and Haber JE. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 349-404

Rashid N, Morikawa M, Imanaka T(1996). A RecA/RAD51 homologue from a hyperthermophilic archaeon retains the major RecA domain only. *Mol Gen Genet.*253:397-400.

Sambrook J; Fritsch EF; Maniats T (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. New York. *Cold Spring Harbor Laboratory*.

Sandler JL, Satin LH, Samra HS, Clark AJ( 1996). *recA* like genes from three archaean species with putative protein products similar to Rad51 and DMC1 proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids res.* 24:2125-2132.

Sancar A. (1994). Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry.* 33: 2-9.

Schwede T, Kopp J, Guex N, and Peitsch MC (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research.* 31: 3381-3385.

Schmidt KJ, Beck KE, Grogan DW (1999). UV stimulation of chromosomal marker exchange in *Sulfolobus acidocaldarius*: implications for DNA repair, conjugation and homologous recombination at extremely high temperatures. *Genetics.* 152:1407-15.

Seitz EM, Kowalczykowski SC (2000) The DNA binding and pariring preferences of the archaeal RadA protein demonstrate a universal characteristic of DNA strand exchange proteins. *Mol Microbiol.* 37 555-560.

Seitz EM, Brockman, JP, Sandler SJ, Clark AJ, Kowalczykowski SC (1998). RadA protein is an archaeal RecA protein homolog that catalyzes DNA strand exchange. *Genes Dev.* 12: 1248-1253.

Shalguev VI, Kil YV, Yurchenko LV, Namsaraev EA, Lanzov VA (2004) Rad51 protein from the thermotolerant yeast *Pichia angusta* as a typical but thermodependent member of the Rad51 family. *Eukaryot Cell.* 3:1567-73.

Sherman F. Getting started with yeast (2002). *Methods Enzymol.* 350:3-41

Shinohara A, Ogawa H, Ogawa T (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell.* 69:457-470.

Soppa J (2006) From genomes to function: haloarchaea as model organisms. *Microbiology.* 152: 585-590

Stasiak A, Egelman EH (1994). Structure and function of RecA-DNA complexes. *Experientia*. 50:192-203.

Stasiak A, Stasiak AZ, Koller T (1984). Visualization of RECA-DNA complexes involved in consecutive stages of an in vitro strand exchange reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 49: 561-570.

Stasiak A, Egelman EH (1986). RecA-DNA helical complexes in genetic recombination. *Biochem Soc Trans* 14: 218-220.

Sugiyama T, Zaitseva EM, Kowalczykowski SC (1997). A Single-stranded DNA-binding Protein Is Needed for Efficient Presynaptic Complex Formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 Protein. *J.Biol. Chem.*272:7940-7945

Studart-Guimarães C, Gibon Y, Frankel N, Wood CC, Zanori MI, Fernie AR, Carrari F (2005). Identification and characterization of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of succinyl CoA ligase of tomato. *Plant Molecular Biology*. 59: 781-791

Sung P (1994). Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast Rad51 protein. *Science*. 265: 1241-1243.

Sung P, and D. L. Robberson DL (1995). DNA strand exchange mediated by a Rad51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell*. 82:453-461

Sung P, Krejci L, Van Komem S and Sehom MG (2003). Rad51 recombinase and recombination mediators. *J. Biol. Chem.*, 278: 42729-42732.

Tracy RB, Kow SC (1996) In vitro selection of preferred DNA pairing sequences by the *Escherichia coli* RecA protein. *Genes Dev*. 10: 1890 – 1903

Tsuzuki T, Fujii Y, Sakumi K, Tominaga Y, Nakao K, Sekiguchi M, Matsushiro A, Yoshimura Y, Morita T (1996). Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:6236-40.

West SC (1997). Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annu Rev Genet.* 31:213-44. Review.

White MF, Giraud-Panis MJ, Pöhler JR, Lilley DM (1997). Recognition and manipulation of branched DNA structure by junction-resolving enzymes. *J Mol Biol.* 269:647-64. Review.

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML(1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 87, 4576-4579.

Woods WG, Dyall-Smith ML (1997). Construction and analysis of a recombination-deficient (radA) mutant of *Haloferax volcanii*. *Mol Microbiol.* 23:791-7.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)