UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização funcional de componentes da resposta ao dano ao DNA em
Aspergillus nidulans: os genes *chkA*, *chkB* e *ddbA*

Joel Fernandes Lima

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização funcional de componentes da resposta ao dano ao DNA em
Aspergillus nidulans: os genes *chkA*, *chkB* e *ddbA*

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em
Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia

Aluno: Joel Fernandes Lima

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman

Ribeirão Preto

2007

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Lima, Joel Fernandes

Caracterização funcional de componentes da resposta ao dano ao DNA em *Aspergillus nidulans*: os genes *chkA*, *chkB* e *ddbA*. Ribeirão Preto, 2007.

122 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, Apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Goldman, Gustavo Henrique.

1. *Aspergillus nidulans*. 2. dano ao DNA. 3. *chkB*. 4. *chkA*. 5. *ddbA*.

Joel Fernandes Lima

Caracterização funcional de componentes da resposta ao dano ao DNA em
Aspergillus nidulans: os genes *chkA*, *chkB* e *ddbA*

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em
Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico

Aos meus queridos pais Antônio e Maria de
Fátima, por dedicarem suas vidas a me
educar e amar incondicionalmente, e por
serem pessoas maravilhosas.

Ao meu irmão Michel e sua esposa Fabiana
pela amizade, carinho e por sempre
acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman. Obrigado pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por toda a dedicação durante a orientação deste trabalho.

A FAPESP, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro ao laboratório e pela bolsa de treinamento técnico de nível III concedida.

A CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de Mestrado concedida ao longo desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

A prof^a. Dr^a. Maria Helena de Souza Goldman e a sua aluna Andréa Carla Quiapin da Faculdade de Filosofia Ciência e Letras-USP, Ribeirão Preto, pelo apoio e por viabilizar as reações de sequenciamento do DNA em seu laboratório.

Ao prof. Dr. Roy Eduard Larson pela viabilização do uso do microscópio confocal, Laboratório de Microscopia Confocal, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –USP.

A Carolina Lissa Masaki, a quem amo, por ser especial e por fazer parte de minha vida tornando-a melhor. Por toda a força, companheirismo, dedicação e respeito dispostos a mim.

As Famílias Castilho e Dallora pela amizade, carinho, incentivo e por compartilharem sua sabedoria comigo, ao Laércio C. L. Neto por ser um amigo verdadeiro, um irmão de coração e a Júlia (*in memorian*) pelos momentos felizes, amor e por me fazer acreditar que tudo é possível.

A todos da minha família, por se importarem comigo e por contribuírem para eu ser uma pessoa melhor: meus avôs Antenor e Sebastião (*in memorian*); minhas avós Maria José (*in memorian*) e Florentina; meus tios Antônio, Carlos, Geraldo, Heber, Luis, Reis, Rubens e Vandeir; minhas tias Ana Carmem, Aparecida, Cecília, Cleide, Cleuza, Norma, Tereza e todos os meus primos e primas. Obrigado a todos.

Aos Amigos do Laboratório, deste e de outros tempos, Dr^a. Camile Pizzeta Semighini, Dr. Iran Malavazi, Dr^a. Marcela Savoldi, Dr^a. Márcia Ferreira da Silva Balieiro, Dr^a. Márcia Regina Von Zeska Kress, Dr. Frederico Marianetti Soriani, Dr. Everaldo dos Reis Marques, José Luís Capellaro, André Mota Jr., Luciano Ângelo Bernardes, Érika do Nascimento, Paula Fagundes de Gouvêa, Ana Cristina Colabardini, Camila Sayuri Matsumoto, Patrícia Alves de Castro, Allan Oliveira e Silva, André Lopes, Álvaro Denis Vale, Davidson Duarte Custódio. Obrigado a todos pela amizade, ajuda, compreensão e pelos bons momentos vividos.

Aos Técnicos que passaram pelo laboratório Lílian Aparecida de Souza e Washington Luís de Lima que igualmente contribuíram para a realização desse trabalho.

A Aline Lacerda que me surpreende a cada dia com sua paciência, delicadeza e Fé.

A todos os amigos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

Aos Funcionários da seção de Pós-Graduação: Ana, Carlos, Eleni e Rosana por todo auxílio dispensado.

A todos que me ensinaram, ajudaram e incentivaram.

*"...E não há melhor resposta
que o espetáculo da vida:
vê-la desfiar seu fio,
que também se chama vida,
ver a fábrica que ela mesma,
teimosamente, se fabrica,
vê-la brotar como há pouco
em nova vida explodida;
mesmo quando é assim pequena
a explosão, como a ocorrida;
mesmo quando é uma explosão
como a de há pouco, franzina;
mesmo quando é a explosão
de uma vida severina."*

João Cabral de Melo Neto, Morte e Vida Severina

RESUMO

LIMA, J. F. **Caracterização funcional de componentes da resposta ao dano ao DNA em *Aspergillus nidulans*: os genes *chkA*, *chkB* e *ddbA*. 2007.** 122 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

A constante exposição dos diferentes organismos a agentes que danificam a estrutura da molécula do DNA fez com que a célula desenvolvesse mecanismos de reparo que se mostraram conservados durante a evolução. Em células de mamíferos, as vias de reparo ao dano ao DNA e a regulação dos pontos de checagem do ciclo celular atuam de forma coordenada no reparo do dano a fim de evitar uma progressão do ciclo celular antes do reparo e uma possível perpetuação do dano. Além disso, alguns dos componentes dessas vias metabólicas também atuam em outros processos, como replicação, transcrição, recombinação meiótica e silenciamento gênico. NER é um importante mecanismo no processo que reconhece e remove dímeros de ciclobutano e 6-4 pirimidina-pirimidona da estrutura do DNA. Em mamíferos foram identificados sete grupos de complementação para células deficientes de XP (XPA-G). Um desses grupos é XPE, conhecido por possuir forte afinidade ao dano ao DNA causado por luz UV, sendo formado por duas subunidades, DDB1 e DDB2. Uma busca no banco de dados de *Aspergillus nidulans* utilizando uma sequência *DDB1* de *Homo sapiens*, revelou uma única sequência com similaridade relevante denominada como DdbA que não possui nenhuma similaridade com a proteína DDB2. Em *Aspergillus nidulans*, a proteína DdbA também está envolvida no reparo do dano ao DNA causado por luz UV e 4-NQO, no entanto, vimos aqui, que DdbA está interagindo com as proteínas UvsB^{ATR}, H2AX e CshB^{CSB} no reparo ao dano ao DNA causado por MMS, Bleomicina, 4-NQO e luz UV. Além disso, uma análise na expressão do gene *ddbA* mostrou que ele é induzido por estas drogas, no estresse oxidativo e nos processos de desenvolvimento assexual e sexual de *A. nidulans*. Nós também vimos que a localização celular de DdbA não foi afetada durante a resposta ao dano ao DNA causado por luz UV e 4-NQO indicando que a proteína DdbA está presente no núcleo independentemente do dano. Em *S. pombe*, as proteínas serina-treonina quinases CHK1 e CHK2 foram identificadas como essenciais para o bloqueio do ciclo celular na fase S em resposta ao dano ao DNA ou em resposta ao estresse replicacional. Essas quinases são fosforiladas pelas quinases ATM e ATR e tem sido extensivamente caracterizadas em *A. nidulans*. Neste fungo, as proteínas ChkA^{CHK1} e ChkB^{CHK2} estão envolvidas na resposta ao dano ao DNA e estão interagindo de forma epistática e sinérgica com as proteínas quinases AtmA^{ATM} e UvsB^{ATR}. Nossos resultados também sugerem que as proteínas ChkA e ChkB podem estar envolvidas em meiose, e atuam em vias complementares durante o bloqueio da fase S do ciclo celular. Além disso, as proteínas AtmA, ChkA, ChkB e UvsB são redundantemente complementares na manutenção do crescimento polar das hifas em *Aspergillus nidulans*.

Palavras-chave: 1. *Aspergillus nidulans*. 2. dano ao DNA. 3. ChkA. 4. ChkB. 5. DdbA. 6. Crescimento polar.

ABSTRACT

LIMA, J. F. **Functional Characterization of DNA damage response components in *Aspergillus nidulans*: the *ddbA*, *chkA* and *chkB* genes.** 2007. 122 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

The constant exposure of different organisms to agents that damage the DNA structure, has provided the cells with repair mechanisms that are conserved during evolution. In mammal cells, the DNA damage repair pathways and the cell cycle checkpoint regulation act together to prevent cell cycle progression before the repair is performed avoiding mutation fixation. However these responses are complex and demand overlapping functions and the intersection of many metabolic pathways. NER is an important mechanism in the process that recognize and remove cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 pyrimidine-pyrimidone photoproduct from the DNA structure. In mammals seven complementation groups for XP deficient cells were identified. One of these groups is XPE, known for having strong affinity to the DNA damage caused by UV light and is formed by two subunits DDB1 and DDB2. A search on the *Aspergillus nidulans* database using a *Homo sapiens* DDB1 sequence, revealed a single ORF with relevant similarity. The *A. nidulans* homologue was deleted and named DdbA. *ddbA* does not have significant similarity to DDB2 protein. In *A. nidulans* the protein DdbA is involved on the DNA damage repair caused by UV light and 4NQO. Additionally *ddbA* is genetically interacting with *uvsB*^{ATR}, histone H2AX and *cshB*^{CSB} the damage repair caused by MMS, BLEO, 4NQO and UV light. Also, an analysis of the gene *ddbA* expression indicated that it is induced by MMS, BLEO, 4-NQO, oxidative stressing agents and by the asexual and sexual development processes of *A. nidulans*. We also verified that the sub-cellular localization of DdbA was not affected by the presence of UV light or 4-NQO indicating that the protein DdbA is constitutively present in the nucleus. In *S. pombe*, the serine treonine kinases CHK1 and CHK2 proteins were identified as essential to the S-phase blockage in response to the DNA damage or replicational stress. These kinases are phosphorylated by ATR and ATM kinases, respectively and have been extensively characterized in *A. nidulans*. In this fungus, the proteins ChkA^{CHK1} and ChkB^{CHK2} are involved on the DNA damage response and are genetically interacting in an epistatic and/or synergistic manner with the AtmA^{ATM} and UvsB^{ATR} kinases. Our results also suggest that the proteins ChkA and ChkB may also be involved in meiosis and act in a complementary way during the S-phase block. Furthermore the AtmA, ChkA, ChkB e UvsB proteins are complementary redundant for the maintenance of the polar growth in *A. nidulans*.

Keywords: 1. *Aspergillus nidulans*. 2. DNA damage. 3. ChkA. 4. ChkB. 5. DdbA. 6. Polar growth.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo ilustrativo do mecanismo de reparo ao dano ao DNA por BER.	4
Figura 2: Modelo ilustrativo do mecanismo de reparo ao dano ao DNA por MMR.	6
Figura 3: Estrutura química das duas maiores fotolesões causada ao DNA.	7
Figura 4: Modelo ilustrativo do mecanismo de reparo ao dano ao DNA por NER.	9
Figura 5: Modelo ilustrativo do mecanismo de reparo ao dano ao DNA por DSB. ...	11
Figura 6: Ciclo de vida do fungo filamentoso <i>Aspergillus nidulans</i>	19
Figura 7: A análise filogenética das proteínas ChkA e ChkB.	59
Figura 8: A construção da linhagem mutante $\Delta chkA^{CHK1}$	61
Figura 9: A construção da linhagem mutante $\Delta chkB^{CHK2}$	62
Figura 10: A sensibilidade dos mutantes $\Delta chkA$ e $\Delta chkB$ a drogas que causam dano ao DNA.	63
Figura 11: Os níveis das expressões dos genes <i>chkA</i> e <i>chkB</i> em resposta a presença de drogas.	64
Figura 12: A sensibilidade à luz UV das linhagens mutantes $\Delta chkA$ e $\Delta chkB$	65
Figura 13: Os valores da expressão dos genes $chkA^{CHK1}$ e $chkB^{CHK2}$ em resposta ao estresse oxidativo.	67
Figura 14: Os valores da expressão dos genes $chkA^{CHK1}$ e $chkB^{CHK2}$ durante o desenvolvimento sexual de <i>A. nidulans</i>	68
Figura 15: A análise do crescimento polarizado em conídios da linhagem selvagem e nos mutantes $\Delta chkA^{CHK1}$ e $\Delta chkB^{CHK2}$	71
Figura 16: O fenótipo de sensibilidade das linhagens duplos mutantes a drogas que causam o dano ao DNA.	73
Figura 17: A viabilidade das linhagens mutantes e duplos mutantes após exposição à luz UV em conídios quiescentes e germinantes.	75
Figura 18: O crescimento polarizado das linhagens mutantes e duplos mutantes. ...	77
Figura 19: A análise filogenética da proteína DdbA.	84
Figura 20: A inativação e a confirmação da linhagem mutante $\Delta ddbA$	86

Figura 21: Os fenótipos da linhagem mutante <i>ΔddbA</i> na presença de agentes causadores de dano ao DNA.	87
Figura 22: Os níveis de expressão do gene <i>ddbA</i> na presença de drogas.	89
Figura 23: Os níveis de expressão do gene <i>ddbA</i> na presença de agentes causadores de estresse oxidativo.	90
Figura 24: Os níveis de expressão do gene <i>ddbA</i> durante os desenvolvimentos assexual e sexual.	91
Figura 25: A localização subcelular da proteína DdbA.	93
Figura 26: Interações genéticas entre os genes <i>ddbA</i> e <i>cshA</i> de <i>A. nidulans</i>	95
Figura 27: Interações genéticas entre <i>ddbA</i> e H2AX-S129A de <i>A. nidulans</i>	97
Figura 28: O crescimento radial das linhagens parentais <i>ΔddbA</i> , <i>ΔatmA</i> , <i>ΔnkuA</i> , <i>ΔuvsB</i> e duplos mutantes na presença de agentes mutagenicos.	98
Figura 29: Viabilidade dos conídios das linhagens <i>ΔddbA</i> , <i>ΔatmA</i> , <i>ΔnkuA</i> e <i>ΔuvsB</i> e duplo mutantes.	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genótipos das linhagens de <i>A. nidulans</i> utilizadas neste trabalho	26
Tabela 2: Soluções estoque de requisitos nutricionais recomendados para complementação das auxotrofias em <i>A. nidulans</i>	33
Tabela 3: Soluções estoque das drogas mutagênicas.	33
Tabela 4: Seqüência dos primers utilizados para a produção dos cassetes de deleção pela técnica “PCR-mediated”	42
Tabela 5: Seqüência dos primers ddbA::gfp.	44
Tabela 6: Descrição dos primers utilizados nas reações de RT-PCR em Tempo Real.	48
Tabela 7: Ensaio de mitose das linhagens mutantes $\Delta chkA$, $\Delta chkB$ e selvagem. ..	70
Tabela 8: Ensaio de mitose das linhagens mutantes $\Delta chkA$, $\Delta chkB$, selvagem e duplos mutantes.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4NQO	óxido de 4-nitroquinolina
6-4-PPS	Fotoproduto 6-4 pirimidina pirimidona
amp ^R	resistência a ampicilina
APC	complexo promotor da anáfase (“anaphase promoting complex”)
ATM	“ataxia telangiectasia “mutated”
ATR	“ATM and Rad3 related”
BER	reparo por excisão de bases (“base excision repair”)
<i>bimE</i>	gene “blocked in mitosis” E de <i>A. nidulans</i>
BLEO	bleomicina
BSA	albumina de soro bovino
Cdc	„Cell division cycle“
cDNA	DNA complementar
Chk	Checkpoint Kinase“
CPDs	Dímeros de ciclobutano
CPT	camptothecin
CS	Síndrome de Cockayne (Cockayne’s Syndrome”)
<i>cshB</i>	gene “Cockayne’s syndrome homolog” A de <i>A. nidulans</i>
DAPI	4, 6-diamino-2-fenilindol
DDB	DNA Damage Binding Protein
DDR	Resposta ao dano ao DNA,
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP	desoxirinnucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DSB	quebra de dupla fita (“double strans break”)
EDTA	ácido etilenodiamina tetraacético
EGTA	ácido etileno glicol-bis(2-aminoetil éter)-N,N,N’,N’ tetraacético
g	gravidade
<i>gfp</i>	gene da proteína fluorescente verde (“green fluorescent protein”)
GG-NER	“Global Genomic”-NER
HR	recombinação homóloga (“homologous recombination)
HU	hidroxiuréia
IR	Radiação ionizante
J	joules
Kb	kilo bases

KDa	kilo Daltons
M	molar
MENA	menadiona
MMR	reparo por emparelhamento errado de bases (“mismatch repair”)
MMS	metil metano sulfonato
mRNA	RNA mensageiro
mus	“MMS – sensitive mutants”
NBS	Síndrome de Nijmegen (“Nijmegen Breakage Syndrome”)
NBT	“nitro blue tetrazolium”
NER	reparo pro excisão de nucleotídeos (“nucleotide excision repair”)
NHEJ	união das extremidades não homólogas (“non homologous end joining”)
<i>nimA</i>	gene “never in mitosis” A de <i>A. nidulans</i>
nm	nanômetros
ORF	fase aberta de leitura (“open reading frame”)
p/p	peso/peso
p/v	peso/volume
PARAQ	paraquat
PIKK	“phosphoinositide 3-kinase related kinase”
<i>pyrG</i>	gene orotidina-5'-fosfato descarboxilase de <i>A. fumigatus</i>
ROS	espécies reativas do oxigênio (“reactive oxygen species”)
rpm	rotação por minuto
RT-PCR	transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
sca	“camptothecin sensitive”
scs	“supressor camptothecin sensitive”
SDS	dodecil sulfato de sódio
TCR-NER	“Transcription Coupled Repair”-NER
TIGR	“The Institute for Genomic Research”
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UV	luz ultravioleta
<i>uvs</i>	gene “ultraviolet sensitive” de <i>A. nidulans</i>
wt	linhagem selvagem (“wild type”)
XP	Xeroderma Pigmentosum

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
SUMÁRIO	viii
1. Introdução.....	1
1.1. A resposta celular ao dano DNA.....	2
1.2. Os pontos de checagem do ciclo celular no reparo ao dano DNA	12
1.3. O fungo <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo experimental	16
1.4. A resposta ao dano ao DNA no modelo experimental <i>Aspergillus nidulans</i>	20
2. Objetivos	23
3.1. As linhagens de <i>A. nidulans</i> utilizadas neste trabalho	26
3.2. Meios de cultura	27
3.2.1. Meios de cultura para <i>A. nidulans</i>	27
3.2.1.1 Meio mínimo (MM).....	27
3.2.1.2. Meio completo (YAG, YUU, YG e YG+UU)	27
3.2.2. Meio de cultura para <i>E. coli</i>	27
3.2.2.1. Meio Luria Bertani (LB).....	27
3.3. Soluções tampões.....	28
3.3.1. Solução de elementos traços	28
3.3.2. Solução de sais 20X concentrada para MM (Kaffer, 1977)	28
3.3.3. Solução de protoplastização para transformação em <i>A. nidulans</i>	29
3.3.3.1. Solução 1 de protoplastização	29
3.3.3.2. Solução 2 de protoplastização	29
3.3.3.3. Solução 3 de protoplastização	29
3.3.3.4. Solução 4 de protoplastização	29
3.3.3.5. Solução 5 de protoplastização	30
3.3.4. Solução de lise para mini prep	30
3.3.5. Solução de neutralização para mini prep	30
3.3.6. Solução de Denhardt (100 X concentrada)	30
3.3.7. Solução depurinizante.....	31
3.3.8. Solução salina citrato (SSC) 20X concentrada.....	31
3.3.9. Solução SDS 10%.....	31

3.3.10. Solução de fixação para microscopia I	31
3.3.11. Solução de fixação para microscopia II	32
3.3.12. Solução estoque de DAPI	32
3.3.13. Solução estoque de cacofluor	32
3.3.14. Solução estoque de requisitos nutricionais	32
3.3.15. Solução estoque das drogas mutagênicas utilizadas	33
3.3.16. Tampão PBS ("Phosphate buffered saline") 10X concentrado	34
3.3.17. Tampão MOPS 10X concentrado	34
3.3.18. Tampão de amostra para eletroforese de RNA	34
3.3.19. Tampão de amostra para eletroforese de DNA	34
3.3.20. Tampão TRIS-Acetato-EDTA (TAE) 50X concentrado	35
3.3.21. Tampão GET para "mini prep"	35
3.3.22. Tampão de extração de DNA	35
3.4. Protocolos adotados	35
3.4.1. Mini preparação do DNA plasmidial	35
3.4.2. Extração de DNA genômico	37
3.4.3. Extração e manipulação de RNA	38
3.4.4. Southern blot alcalino	39
3.4.5. Marcação de sonda radioativa	39
3.4.6. Hibridização das membranas de Southern blot	39
3.4.7. Inativação gênica em <i>A. nidulans</i> pela técnica "PCR-mediated"	40
3.4.8. A identificação da deleção do gene <i>chkA^{chk1}</i>	42
3.4.9. A identificação da deleção do gene <i>chkB^{chk2}</i>	43
3.4.10. A identificação da deleção do gene <i>ddbA^{ddb1}</i>	43
3.4.11. Construção de uma linhagem condicional <i>alcA::gfp::ddbA</i>	44
3.4.12. Preparo de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i>	45
3.4.13. Eletrotransformação de <i>E. coli</i>	45
3.4.14. Transformação em <i>A. nidulans</i>	46
3.4.15. Reação de PCR quantitativo em tempo real ("Real time RT-PCR")	47
3.4.16. A análise da expressão de RNAm na presença do dano ao DNA causado por luz UV	48
3.4.17. Análise da expressão de RNAm na presença de agentes mutagênicos	49
3.4.18. Análise da expressão de RNAm na presença de agentes que causam estresse oxidativo	49
3.4.19. Análise da expressão de RNAm durante o desenvolvimento assexual de <i>A. nidulans</i>	50
3.4.20. Análise da expressão de RNAm durante o desenvolvimento sexual de <i>A. nidulans</i>	50
3.4.21. Análise das linhagens que apresentam fusão com GFP	51
3.4.22. Cruzamentos entre linhagens mutantes de <i>A. nidulans</i>	51
3.4.23. Determinação do percentual de sobrevivência após exposição à luz UV	52
3.4.24. Determinação da sensibilidade a agentes mutagênicos	52
3.4.25. Determinação da funcionalidade do ponto de checagem intrafase S (Ensaio de Mitose)	53
3.4.26. Determinação da polarização do crescimento em conídeos	53
3.4.27. Estoque de linhagens	54
3.4.28. Análise estatística	54
4. Resultados e Discussão	55

4.1. Modulo 1: Isolamento e caracterização fenotípica dos mutantes $\Delta chkA^{chk1}$ e $\Delta chkB^{chk2}$ em <i>A. nidulans</i>.	56
4.1.1. A identificação dos genes $chkA^{CHK1}$ e $chkB^{CHK2}$ de <i>A. nidulans</i>	57
4.1.2. A inativação dos genes $chkA^{chk1}$ e $chkB^{chk2}$ de <i>A. nidulans</i>	60
4.1.3. A participação dos genes $chkA^{CHK1}$ e $chkB^{CHK2}$ na resposta celular ao dano ao DNA	62
4.1.4. A participação dos genes $\Delta chkA^{CHK1}$ e $\Delta chkB^{CHK2}$ na resposta ao dano ao DNA causado por luz UV	64
4.1.5. A Participação dos genes $\Delta chkA^{CHK1}$ e $\Delta chkB^{CHK2}$ na resposta ao estresse oxidativo	66
4.1.6. A participação dos genes $chkA$ e $chkB$ durante a reprodução sexuada em <i>A. nidulans</i>	67
4.1.7. A participação dos genes $\Delta chkA^{CHK1}$ e $\Delta chkB^{CHK2}$ no ponto de checagem da fase S	69
4.1.8. A Participação dos genes $chkA^{CHK1}$ e $chkB^{CHK2}$ no crescimento polarizado em conídios de <i>A. nidulans</i>	70
4.1.9. As possíveis interações genéticas envolvendo os genes $chkA^{CHK1}$, $chkB^{CHK2}$, $atmA^{ATM}$ e $uvsB^{ATR}$	72
4.1.10. Discussão	78
4.2. Modulo 2: Isolamento e caracterização fenotípica do mutante $ddbA^{DDB1}$ em <i>A. nidulans</i>.	83
4.2.1. A identificação do gene $ddbA$ de <i>A. nidulans</i>	84
4.2.2. A inativação do gene $ddbA^{DDB1}$ em <i>A. nidulans</i>	85
4.2.3. A Participação do gene $ddbA^{DDB1}$ na resposta celular ao dano ao DNA	86
4.2.4. O papel do gene $ddbA^{DDB1}$ na resposta celular ao estresse oxidativo	89
4.2.5. O papel do gene $ddbA^{DDB1}$ no desenvolvimento assuxual e sexual de <i>A. nidulans</i>	90
4.2.6. A localização celular da proteína DdbA	92
4.2.7. Possíveis interações genéticas de $ddbA^{DDB1}$ em <i>A. nidulans</i>	93
4.2.8. Discussão	99
5.0. Conclusões	105
6.0. Referências Bibliográficas	108

1.1. A resposta celular ao dano DNA

Sabe-se que todas as células vivas existentes, sem nenhuma exceção, armazenam suas informações hereditárias na forma de moléculas de DNA em fitas duplas, onde se encontram dispostas em longas cadeias poliméricas pareadas e não ramificadas, formadas pelos monômeros, Adenina, Timina, Citosina e Guanina. Entretanto, o sucesso da molécula de DNA como transmissor da informação genética tornou-se possível graças a sua estabilidade, resistência e por sua grande eficiência e fidelidade no processo catalítico replicativo que sua estrutura helicoidal permite.

Embora a molécula do DNA seja estável e resistente, sua estrutura sofre constantes mutações que podem ser causadas por fatores endógenos, como por exemplo, as espécies reativas ao oxigênio (ROS) e o colapso da forquilha de replicação, ou exógenos como aquelas causadas por radiação ionizante (IR), luz ultravioleta (UV) e outros aductos químicos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, nitrosaminas, agentes alquilantes e também a grande maioria dos quimioterápicos antitumorais (NOBURY; HICKSON, 2001; SANCAR et al., 2004). Algumas dessas mutações podem ser benéficas aos organismos por permitirem maior variabilidade genética, transformando-se em peças chave para evolução. No entanto, um excesso destas mutações pode levar a alterações no esqueleto carbônico da molécula, desencadeando uma resposta ao dano ao DNA (DDR).

Em células de mamíferos, as vias de reparo ao dano ao DNA, a regulação dos pontos de checagem do ciclo celular, a resposta transcricional e a apoptose são as principais respostas metabólicas ativadas como resposta ao dano ao DNA (SANCAR et al., 2004) e a presença de danos em genes essenciais para que ocorra o reparo ao dano ao DNA, podem resultar no desenvolvimento de tumores e várias outras doenças hereditárias caracterizadas por alterações metabólicas dos complexos de reparo (CHRISTMANN et al., 2003).

Para que um dano desencadeie um mecanismo de reparo celular, ele deve ser reconhecido por proteínas que modulam a atividade de genes reguladores da resposta celular. Nos eucariotos essa resposta é complexa, envolvendo a sobreposição e a intersecção de diversas vias metabólicas. Além disso, alguns dos componentes dessas vias metabólicas também atuam em outros processos, como replicação, transcrição, recombinação meiótica e silenciamento gênico (SEKELSKY et al., 1998). Tais vias foram classificadas de acordo com seu mecanismo de reparo

como: reparo por excisão de bases (“base excision repair” – BER); reparo por emparelhamento errado de bases (“mismatch repair” – MMR); reparo por excisão de nucleotídeos (“nucleotide excision repair” – NER); e reparo de quebra de dupla fita (“DNA double strand break repair” – DSB).

Embora todas as vias metabólicas de reparo ao dano ao DNA sejam de extrema importância para uma correta transcrição e replicação do material genético, uma via essencial para o reparo ao dano ao DNA causado por agentes alquilantes e oxidantes é a BER. Este processo inicia-se com a ação da enzima DNA glicosilase que reconhece e remove a base oxidada, alquilada ou deaminada primariamente ao reparo, hidrolizando a ligação N-glicosídica das bases nitrogenadas para que ocorra a liberação da base danificada e mantendo a estrutura fosfato do DNA intacta e assim, gerando uma região abásica (AP apurínico/apiridínico) (SANCAR et al., 2004; FORTINI et al., 2003). Após a retirada da base, o sítio será reconhecido e clivado por AP-endonucleases. As APs realizam a quebra do esqueleto de açúcar nas posições 3' e 5' do nucleotídeo. A lacuna gerada pela retirada do nucleotídeo será preenchida pela ação da enzima DNA polimerase β envolvida na síntese de DNA (MEMISOGLU E SAMSON, 2000). O reparo é concluído quando o nucleotídeo danificado é substituído por um novo nucleotídeo e esse novo nucleotídeo é covalentemente ligado ao esqueleto carbônico do DNA através da ação das enzimas DNA ligase III. A subunidade não catalítica XRCC1 atua dando suporte e recrutando as enzimas DNA polimerase β e DNA ligase III (Figura 1).

Figura 1: Modelo ilustrativo do mecanismo de reparo ao dano ao DNA por BER. Extraído e modificado de Tudek B. et al (2006). **(A)** O DNA sofre a lesão. **(B)** A glicosilase remove a base alterada e deixa um sítio AP. **(C)** O sítio AP é subsequentemente excisado pela AP endonuclease 1. **(D)** XRCC1 reconhece a lacuna e recruta a DNA polimerase β que por sua vez, insere um novo nucleotídeo na lacuna. **(E)** A proteína DNA ligase III promove as ligações covalentes do novo nucleotídeo na estrutura do DNA, e assim, o reparo termina.

Em mamíferos, o sistema de reparo ao dano ao DNA por MMR funciona no genoma, na fase pós-replicacional, detectando e reparando mutações causadas por substituições de bases, pequenas inserções ou deleções de nucleotídeos e suprimindo a recombinação homóloga entre seqüências que não são completamente homólogas (EDELMANN; EDELMANN, 2004).

Em *Saccharomyces cerevisiae* foram identificados seis homólogos MutS (MutS1-6) e cinco homólogos MutL (MutL1-3 e PMS1-2). Nesse organismo, o reparo se inicia pelo complexo heterodimérico MSH2-MSH6 (conhecidos como MutS α) e representa entre 80% a 90% do MSH2 existente na célula reconhecendo preferencialmente inversões de base, inserções ou deleções (ID) de até 2 nucleotídeos no DNA recém replicado (MARTI et al., 2002; SIA; KIRKPATRICK, 2005; Modrich, 2006). O complexo heterodimérico MSH2-MSH3 (conhecido como MutS β) é mais específico para IDs entre 3 a 10 nucleotídeos.

Após o dano ser reconhecido ocorrerá o recrutamento do complexo MLH1-PMS1, que por sua vez, atua recrutando outras proteínas que irão remover e reparar o DNA (Figura 2). Para o exercício da função dos complexos MSH2-MSH3 e/ou MSH2-MSH6 foi identificada uma proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferação

celular). A proteína PCNA discrimina entre as fitas de DNA integras e o local do emparelhamento errado de bases, estimulando assim a ligação preferencial do complexo Mut α e/ou Mut β nesta fita. Para tal função, foi identificado um domínio de ligação de PCNA nas proteínas MSH6 e MSH3 de *S. cerevisiae* (FLORES-ROZAS et al., 2000). Após serem recrutadas até a região do dano pelos complexos MLH1/PMS1 e MLH1/PMS2, as proteínas exonucleases, RPA, FEN I, PCNA e DNA polimerase são as responsáveis diretas pela remoção dano e inserção dos novos nucleotídeos na região onde ocorreu a síntese errônea do DNA.

Os indivíduos que carregam mutações em genes envolvidos no reparo ao dano ao DNA por MMR são acometidos pela síndrome mais comum de predisposição ao câncer conhecida em humanos, à neoplasia “hereditary nonpolyposis colorrectacer” (HNPCC) (EDELMANN; EDELMANN, 2004).

Figura 2: Modelo ilustrativo do mecanismo de reparo ao dano ao DNA por MMR. Extraído e modificado de Modrich P (2006) e Applied Biosystems. (A) Os complexos Muta e Mutβ reconhecem a os pareamentos errados, discriminados por PCNA após a reliação do DNA. (B) O complexo MLH1/PMS2 se liga a região reconhecida e recruta outras proteínas para o reparo. (C) As proteínas envolvidas no reparo se ligam ao DNA e o efetuam. (D) O malpareamento é reparado após a remoção, a síntese de Dna e a ligação.

NER, é um sistema altamente sofisticado de reparo ao dano ao DNA e é responsável por neutralizar os defeitos causados por ligações cruzadas entre pirimidinas adjacentes na cadeia do DNA [dímeros de ciclobutano (CPDs) e fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PPs)] gerados por luz UV, além de

ligações intracadeias de DNA ocasionadas por agentes químicos (FRIEDBERG et al., 2006) (Figura 3).

Figura 3: Estrutura química das duas maiores fotolesões causada ao DNA. **P** = fosfato, dR = desoxirribose.

São conhecidas duas sub-vias distintas no reparo ao dano ao DNA por NER em mamíferos. “Global Genomic” NER (GG-NER) que opera em todo o genoma e “Transcription Coupled Repair” NER (TCR-NER) que se limita a reparar os danos existentes em genes ativos durante a transcrição. A principal diferença entre essas duas sub-vias consiste no reconhecimento do dano no DNA. Em TCR-NER, um bloqueio na atividade da RNA polimerase II, que ocorre na presença do dano ao DNA durante a transcrição, permite o reconhecimento do dano pelas proteínas CSA e CSB (Síndrome de Cockayne), sendo que estas proteínas são essenciais para um rápido e eficiente início da reação de reparo ao dano ao DNA durante a transcrição (TORNALETTI & HANAWALT 1999) (Figura 4 esquerda).

De maneira diferente, em GG-NER o dano é reconhecido por proteínas que possuem afinidade específica para o dano ao DNA causado por luz UV e são conhecidas como proteínas XPE-UVDB (Xeroderma Pigmentoso - DNA “damage binding protein”). Após o dano ser reconhecido pelo complexo proteico XPE-UVDB/CSN/CulA4/Roc1/E3 inativo, a proteína CulA4 é nedilada e a proteína CSN (COP9 “Signalosome”) é liberada tornando o complexo UV-DDB/E3 ativo. As proteínas HR23B e XPC são então recrutadas para a região do dano e ubiquinadas tornando sua ligação à região do dano mais forte e promovendo a liberação do complexo de reconhecimento (UV-DDB/CulA4/Roc1) e posterior degradação de DDB2 (Figura 4 direita).

Após o dano ser reconhecido por uma das sub-vias específicas de NER, os processos subsequentes do reparo envolvem o mesmo mecanismo. O complexo multifuncional de transcrição/reparo (TFIIH), que contém duas subunidades helicases (as proteínas XPB e XPD) se liga a região do dano separando as fitas do DNA danificado formando assim uma região aberta, o que facilita a associação de outras proteínas à região do dano (YOKOI et al. 2000; ARAÚJO et al. 2001). Juntamente ao complexo TFIIH, as proteínas RPA e XPA associam-se ao DNA danificado estabilizando a região fita dupla aberta do DNA o que facilita a associação de outras proteínas que são específicas ao DNA fita simples. Este evento ajuda no posicionamento das proteínas XPF-ERCC1 e XPG que rompem a fita simples do DNA danificado nas regiões 5' e 3' ao dano removendo a fita danificada. Após a remoção da região que contém o dano ocorrerá a síntese de um novo fragmento de DNA (Figura 4).

UV-DDB (XPE) foi identificado bioquimicamente como um fator protéico que exibe uma ligação forte e específica ao DNA quando este apresenta dano causado por luz UV sendo formado por duas subunidades associadas. DDB1 com 127 kDa e 1.140 aminoácidos, uma proteína altamente conservada em eucariotos e levedura, porém, não foi encontrada em *S. cerevisiae*, e DDB2 com 48 kDa e 427 aminoácidos sendo menos conservada durante a evolução (CHU & CHANG 1988; KEENEY et al., 1993; TAKÃO et al., 1993; DUALAN et al., 1995; HWANG et al., 1996; SUGASAWA 2006).

Defeitos nos genes XP causam Xeroderma Pigmentosum (XP), uma doença autossômica recessiva que tem por característica a excessiva sensibilidade à luz UV levando ao desenvolvimento de câncer de pele de origem queratinosa e defeitos nos genes CS, exibem um fenótipo pleiotrópico caracterizado por sensibilidade a UV e envelhecimento prematuro, sendo que CS esta frequentemente associada ao XP (MAGNALDO; SARASIN, 2004; FRIEDBERG et al., 2006).

Figura 4: Modelo ilustrativo do mecanismo de reparo ao dano ao DNA por NER. Extraído e modificado de Mc Loughlin 2007 e Sugawara, (2005 e 2006). **(A)** TCR-NER reconhece preferencialmente 6-4PPs durante a transcrição pela ação da RNA polII. Após o reconhecimento as proteínas CSA e CSB migram para a região do dano bloqueando a transcrição e liberando a RNA polII para que ocorra o reparo. **(B)** GG-NER reconhece preferencialmente CPDs pela ação do complexo multi protéico CSN/DDB/Cul4/E3 inativo, e atua recrutando as proteínas HR23B/XPC que serão ubiquitinadas liberando o complexo DDB/Cul4/E3 ativo para que a região do dano seja reconhecida por outras proteínas que atuam no reparo. **(C)** As proteínas TFIIH, XPD, XPB e TFB iniciam o processo posterior ao reparo estabilizando a região do dano na qual ocorre do mesmo modo para ambas as vias. As proteínas XPF/ERCC1 e XPA se ligam nas extremidades danificadas rompendo-as e removendo a parte danificada. Após a remoção um novo fragmento é sintetizado.

Dentre os tipos de dano ao DNA nas quais as células estão constantemente expostas, o DSB é o mais deletério deles. DSB ocorre quando as ligações dos açúcares de ambas as fitas são quebradas próximas o suficiente para romper as bases pareadas, resultando na liberação de duas pontas. Estas lesões ocorrem espontaneamente durante o processamento normal do DNA (replicação do DNA e meiose) e pode ser induzida por uma variedade de agentes causadores de dano ao DNA, como a Bleomicina.

Em eucariotos, a DSB é reparada por dois mecanismos distintos, cujas vias estão interligadas: a recombinação homóloga (HR) e a união das extremidades não homólogas (“non homologous end joining” – NHEJ). A ausência ou a função incorreta destes mecanismos pode resultar na fusão das pontas do DNA que originalmente podem estar distantes no genoma, gerando assim rearranjos cromossômicos como inversões, translocações e deleções (BASSING & ALT 2004).

Existem muitas proteínas envolvidas no reconhecimento e resposta às quebras cromossômicas no reparo por NHEJ. Entre elas, existem três proteínas, Ku70/80 e a subunidade catalítica DNA-Pkcs que fazem parte da proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK) (BASSING & ALT 2004). As proteínas Ku se ligam às pontas das DSBs e atuam de modo a remodelá-las para que ocorra o reconhecimento de outras proteínas, e assim, possibilitar a união das extremidades rompidas das fitas de DNA (FEATHERSTONE; JACSON, 1999). (Figura 5 B).

Ao contrário da NHEJ, a HR requer um amplo processamento das extremidades 5' (sentido 5' → 3') para gerar regiões de fita simples no local da quebra. O grupo de proteínas epistáticas RAD51, RAD52, RAD54, e MRE11 medeiam esse processo que se inicia com o reconhecimento da região danificada pela proteína RAD52 (SONODA et al. 2001). Após o processamento da região danificada, a proteína RAD51 se liga à região do DNA fita simples gerada, juntamente com outras proteínas que incluem, RAD52, RAD54, MRE11, RPA, BRCA1 e BRCA2, para que ocorra o reconhecimento da região homóloga em sua cromátide irmã (JACKSON, 2002). Uma vez identificada a região homóloga, as fitas simples geradas invadem o duplex de DNA homólogo, que servirá de molde para a restauração da DSB. Como na HR a informação genética é copiada a partir de sua cromátide irmã, esse processo é altamente preciso e eficiente (LISBY et al., 2004; HELLEDAY et al., 2007) (Figura 5 A).

Figura 5: Modelo ilustrativo do mecanismo de reparo ao dano ao DNA por DSB. Extraído e modificado de R & D Systems. **(A)** Recombinação homóloga. RAD52 reconhece o dano para que outras proteínas processem as extremidades rompidas formando um complexo para o reconhecimento da região homóloga em sua cromátide irmã. Uma vez identificada a região homóloga, as fitas simples geradas invadem o duplex de DNA homólogo e em seguida a DNA polimerase sintetiza uma nova fita de DNA a partir da região 3' deixada, na qual será posteriormente ligada pela DNA ligase I. **(B)** As proteínas Ku e DNA PKcs reconhecem as DSBs remodelando-as para que ocorra o reconhecimento de outras proteínas, e assim, possibilitar a união das extremidades rompidas das fitas de DNA.

Além da maquinaria recombinacional para o reparo ao dano ao DNA, ocorre também a ativação dos pontos de checagem do ciclo celular modulando a atividade de genes reguladores da resposta celular, de maneira a interromper a mitose proporcionando tempo hábil à célula para que os danos sejam reparados antes de eventos críticos como, replicação e segregação na qual exercem papel os pontos de checagem G1/S, (impedindo a duplicação do DNA) e G2/M (impedindo a transmissão do erro às células filhas) (YARNOLD, 1997; ZHOU & ELLEDGE, 2000; HOFFMAN & HARRIS, 2000; CLARKE & GIMENEZ-ABIAN, 2000). Embora os pontos de checagem sejam distintos, as proteínas que atuam como sensores de dano ao DNA e que os ativam, parecem ser compartilhadas, sendo que as suas

funções podem ser primárias ou coadjuvantes, dependendo do ponto de checagem em que operam (SANCAR et al., 2004).

Os componentes envolvidos nos pontos de checagem do ciclo celular encontram-se dispostos em quatro tipos, de acordo com suas posições e funções: (i) sensores do dano ao DNA, (Classes: “RFC1-like e PCNA-like”), (ii) mediadores {classes: “BRCT-containing” e “DSB recognition/repair” (MRN complex)}, (iii) transdutores de sinal (classes: “P13 kinase-like protein, PIKK binding protein e Protein kinase”) e (iv) efetores (classes: fatores de transcrição, fosfatases e proteínas quinases) (NIIDA & NAKANISHI, 2006).

As proteínas quinases Atm (“Ataxia-telangiectasia mutated”), Atr (“Atm and Rad3 related”), Chk1 (“Checkpoint kinase 1”) e Chk2 são transdutores de sinal cuja função é fosforilar diferentes efetores como p53, Cdc25 e também mediadores como BRCA1 e NBS1 do complexo Mre11. Os elementos mais a montante das cascatas ativadoras dos pontos de checagem são conservados em diferentes respostas dependendo do tipo de lesão no DNA (BARTEK & LUKAS, 2001).

As síndromes de instabilidade cromossômica herdadas em humanos como a síndrome de Bloom, Anemia de Fanconi, Síndrome de Li-Fraumeni, Xeroderma Pigmentosum, Ataxia Telangiectasia (AT), Ataxia Telangiectasia “Like Disease” (ATLD), e Síndrome de Nijmegen (NBS), exemplificam deficiências no sistema de reparo ao dano (para revisão ver D’AMOURS & JACKSON, 2002; PETRINI, 1999).

1.2. Os pontos de checagem do ciclo celular no reparo ao dano DNA

Os pontos de checagem da integridade do DNA durante a progressão do ciclo celular têm como missão transmitir uma cópia íntegra do genoma e a correta divisão dos cromossomos. Para conseguir realizar suas funções vitais, as células possuem dentro de cada fase do ciclo celular, mecanismos eficientes na detecção das lesões causadas ao DNA. O bloqueio ou atraso da progressão do ciclo celular proporciona o tempo necessário para o reparo ao dano ao DNA que é mediado por várias vias de sinalização conhecidas como pontos de checagem do ciclo celular e denominadas G1, fase-S e G2/M. Estas cascatas bioquímicas são compostas por proteínas que fazem o sensoramento e monitoramento na presença de qualquer anormalidade no genoma e ajudam a gerar os sinais que são amplificados pelos adaptadores/mediadores e transdutores de sinal e propagados para os efetores do

ponto de checagem. Os efetores por sua vez, conectam os pontos de checagem com a maquinaria do ciclo celular.

A fase G1 é um período onde a célula toma decisões críticas sobre seu estado, incluindo a opção pela replicação do DNA e finalização do ciclo celular. Quando o DNA está danificado, a célula que está em G1 ativa suas quinases transdutoras do ponto de checagem ATM/ATR e Chk1/Chk2 que por sua vez ativam os efetores que operam em direções distintas do ponto de checagem G1.

Sabe-se que o bloqueio na fase G1 ocasionado pela resposta deste ponto de checagem envolve a fosfatase cdc25A, e o fator de transcrição e gene supressor de tumor p53 (CLARK; GIMENEZ-ABIÁN, 2000; BARTEK; LUKAS, 2001). Na presença de dano ao DNA, p53, uma molécula instável e com limitada capacidade de ligação ao DNA, sofre várias modificações pós-traducionais que estabilizam a molécula no DNA, estimulando a transcrição de inibidores do ciclo celular, dentre eles p21, que, em altos níveis, reprime o complexo CDK2/ciclina inibindo a replicação do DNA por interação com PCNA (uma subunidade da DNA polimerase δ) (BARTEK & LUKAS, 2001). Porém, o ponto de checagem da fase G1 dependente de p53, e, por conseguinte de suas modificações pós traducionais para síntese de p21, é demasiado lento para explicar a rápida inibição de CDK2 na presença de dano ao DNA nessa fase do ciclo celular. Além disso, o silenciamento de CDK2 ocorre mesmo em células onde p53 está inativo, indicando que o ponto de checagem G1/S pode ocorrer de duas formas, uma mais lenta, mediada por p53, a qual é totalmente operacional horas após a detecção do dano e outra mais rápida que atua independente de transcrição e síntese protéica, possivelmente explorando um mecanismo que inativa a proteína Cdc25 fosfatase impedindo a defosforilação de CDK2 essencial para a transição G1/S (BARTEK & LUKAS, 2001; SANKAR et al., 2004; Lukas; Lukas; Bartek, 2004).

O ponto de checagem da fase S é um fenômeno transitório que ocorre a partir da queda na taxa de síntese de DNA. Diferentemente dos pontos de checagem G1/S e G2/M, este pode ser benéfico para a célula por promover um atraso não permanente no ciclo celular na presença do genoma incompletamente replicado. A primeira via descrita na fase S do ciclo celular, que liga as quinases do ponto de checagem apicais com a maquinaria do ciclo celular, foi a cascata ATM/ATR-Chk1/Chk2-Cdc25A-ciclinaE(A)/Cdk2-Cdc45 (FALCK et al., 2002). Entretanto, já é conhecido que a via de degradação da ciclina E(A) não é a única cascata que

coordena o ponto de checagem da fase S, sendo que outro ramo deste ponto de checagem parece ser a ativação por fosforilação mediada pela ATM na serina 343 da proteína NBS1 (D'AMOUS & JACKSON, 2002).

Na presença de dano ao DNA durante a progressão da fase S, ATR-Chk1 ativadas, fosforilam Cdc25A para que ocorra sua ubiquitinação, degradação e conseqüentemente, supressão da ativação de Cdc2 não permitindo que a proteína Cdc45, uma proteína requisitada para o processo de replicação e recrutamento de DNA polimerase γ , se integre à cromatina, resultando na inibição de uma nova origem de replicação (ARATA, et al., 2000). Sabe-se também que o ponto de checagem intrafase S é independente de p53. Em *A. nidulans* os mecanismos de bloqueio das fases G1/S e S apresentam as mesmas características funcionais apresentadas nas células de mamíferos, entretanto o eixo final envolve a inativação de CDK1 (NimX^{CDC2}/ciclina B) pela fosforilação inibitória de NimX^{CDC2} por uma quinase AnkA^{WEE1} e inativação de NimT^{CDC25} (OSMANI; YE, 1996, OSMANI; YE, 1997).

O ponto de checagem G2/M, tal qual o ponto G1, previne a célula de iniciar a mitose quando existir algum dano ocorrido na fase G2 ou até mesmo oriundos das fases G1 e S do ciclo celular. Sendo análogo do ponto de checagem G1, o bloqueio ou atraso do ciclo celular na fase G2 é o resultado de uma combinação de mecanismos que operam por modificações pós-traducionais de diversas proteínas efetoras, e com mecanismos de atraso e sustentação que envolve também alterações do programa transcricional (ABRAHAM, 2001; NYBERG et al, 2002). Quinases bloqueiam a entrada em mitose inibindo Cdc25 ou ativando Wee1 as quais conjuntamente controlam a atividade de Cdk1 (complexo Cdc2-ciclina B), sendo o principal alvo de checagem G2/M em mamíferos e também em *A. nidulans*, porém não em *S. cerevisiae* (YE et al, 1997). Em *A. nidulans*, bimE^{APC1} é um elemento necessário para prevenir a entrada prematura em mitose quando a síntese de DNA é totalmente bloqueada por agentes que causam estresse replicacional (YE et al, 1996).

São conhecidas duas classes de transdutores de sinal envolvidos na resposta ao dano ao DNA: (i) a ATM e a ATR quinases', que são da família das "PIKK" ("phosphoinositide 3-kinase related kinase") (ABRAHAM, 2001), e (ii) Chk1 e Chk2 ("checkpoint kinases"), que são duas serina/treonina proteínas quinases (FERRARA & KMIEC, 2006).

Em mamíferos, a sinalização do dano ao DNA é rapidamente feita pela ATM e ATR, sendo responsáveis pela fosforilação de diversos alvos, entre eles, proteínas que coordenam as modificações da cromatina como a histona H2AX, outros transdutores como Chk1, Chk2, Nbs1 e proteínas que induzem a apoptose (p.ex., p53) (NYBERG et al., 2002; MCKINNON, 2004). Em *A. nidulans* AtmA^{ATM} previne a entrada em mitose na presença do dano ao DNA durante as fases S e G2/M do ciclo celular e ao contrário de UvsB^{ATR} não está envolvido na inibição da septação (MALAVAZI, I. et. al., 2006). Notavelmente, UvsB^{ATR} regula a expressão e a localização nuclear de scaA^{NBS1} (FAGUNDES et al., 2005), enquanto AtmA^{ATM} controla os níveis de fosforilação dessa proteína.

Os substratos de ATM e ATR e Chks são geralmente responsáveis diretos pelo reparo do dano ao DNA, regulação transcricional, controle do ciclo celular, e indução de morte celular. É importante enfatizar que embora o papel de muitos destes transdutores seja razoavelmente conhecido, particularmente em mamíferos e leveduras, os mecanismos pelo qual o sinal do dano ao DNA modifica suas atividades não é bem conhecido. Em linhas gerais, a escolha dos transdutores de sinal reflete o tipo de dano ao DNA presente na célula, embora alguma sobreposição de funções entre os segmentos ATR/CHK1 e ATM/CHK2 possa existir (BARTEK & LUKAS, 2001).

As PIKKs ATM e ATR têm um papel chave no início da DDR (SHILOH, 2003; ABRAHAN, 2003). Embora a ATM seja primariamente ativada em DDR por DSBs causados por radiação ionizante ou drogas radiomiméticas, ATR responde ao estresse replicativo e outras formas de dano ao DNA, como por exemplo aqueles causados por luz UV. As proteínas ATM e ATR são recrutadas para os sítios de dano ao DNA por mecanismos próximos, porém diferentes. Enquanto ATM é recrutado pelo complexo MRE11-Rad50-NBS1 (MRN), ATR está sendo recrutado por uma proteína de interação/ATR (ATRIP). Da mesma forma, o homólogo de NBS1 em *A. nidulans* (ScaA) também é fosforilado por AtmA^{ATM} (MALAVAZI, 2007).

CHK1 ("checkpoint kinase" 1) é um transdutor de sinal que tem sua serina^{317/345} fosforilada pela ATR quinase na presença do dano ao DNA em humanos e leveduras (ZHAO & PIWNICA-WORMS, 2001). Em humanos, a ausência da proteína Chk1 resulta na entrada prematura em mitose através da defosforilação de Cdc2 na Tyr15, podendo levar a propagação do dano ao DNA e/ou a apoptose. Estudos recentes em *Xenopus* demonstraram que Chk1, mas não Chk2, fosforila a

porção terminal dos membros da família Cdc25 inibindo a sua atividade fosfatase para o complexo Cdk-ciclina através da interferência na interação entre Cdc25 e Cdk-ciclina (NIIDA, & NAKANISHI, 2006).

Chk2 (“checkpoint kinase” 2), um transdutor de sinal fosforilado pela ATM, é um elo entre as proteínas transdutoras ATM a ATR que orquestram o reparo ao dano ao DNA e alguns efetores de sinal. Alterações na proteína quinase CHK2 têm sido associadas com tumores, qualificando o gene como supressor tumoral (MATSUOKA et al 2001). Em muitos sistemas, Chk2 atua fosforilando as fosfatases Cdc25A e Cdc25C. A fosforilação de Cdc25C/serina²¹⁶ por Chk2 previne a sua defosforilação ativando o complexo Cdc2-ciclina B requerido para entrada em mitose. Chk2 pode também fosforilar, e assim estabilizar p53 possibilitando que esta proteína funcione como um transativador sustentando uma parada nos pontos de checagem G1, G2, e eventualmente a apoptose (BARTEK et al., 2001; CHEHAB et al., 2000; HIRAO et al., 2000).

O fato é que Chk1 e Chk2 têm papéis redundantes no início da DDR sugerindo uma sobreposição de ambas as quinases. Novos estudos indicam que Chk1 e Chk2 atuam na fosforilação de outras proteínas que podem ou não estar envolvidas no sistema de reparo ao dano DNA como as proteínas FANCG/XRCC9 (envolvidos no reparo de DSB na fase S e quando ausente pode levar a Anemia de Fanconi), MAD1 (um componente do ponto de checagem mitótico), PP2A PR130 [uma subunidade regulatória da proteína fosfatase 2 (PP2A), e PR130 uma das quatro maiores Ser/Thr fosfatases o qual esta implicada no controle negativo do crescimento celular], Ciclina G (pode regular negativamente p53-mdm2), ST5 (proteína supressora tumoral), GATA-3 (implicado no desenvolvimento de câncer e regulador de T-cell), HDAC5 (envolvido na regulação transcricional, progressão do ciclo celular, diferenciação e apoptosi) o qual tem sua serina⁴⁹⁸ especificamente fosforilada por Chk2 e PGC1 (um coativador transcricional, que tem um papel essencial na biogênese mitocondrial) sua serina²⁸⁵ é um alvo específico para Chk1 e Chk2 (KIM et al., 2007).

1.3. O fungo *Aspergillus nidulans* como modelo experimental

O gênero *Aspergillus* consiste de muitas espécies bem caracterizadas, pertencentes ao grupo Ascomiceto. Dentre elas está o *A. nidulans*. Este fungo é um saprófita que pode ser isolado do solo, podendo ocorrer como bolor em alimentos. O

fato de ser saprófita permite que esse fungo filamentoso utilize uma grande variedade de matérias como fonte nutricional, além de ser capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura. Isto reflete em seu cultivo laboratorial, realizado em um meio de cultura simples contendo diferentes fontes de carbono e nitrogênio. A espécie *A. nidulans* possui 8 cromossomos geneticamente bem caracterizados, 9.541 genes e genoma de 30.068.514 pb (TIMBERLAKE, 1990; GALAGAN et al., 2005). Este fungo possui uma frequência de transformação apreciável e apresenta recombinação sítio específica. Vetores binários e bibliotecas genômicas, de cDNA e cosmidiais como específicas estão disponíveis, tornando a clonagem, substituição e a deleção de genes relativamente fáceis. Promotores induzíveis e reprimíveis podem ser utilizados para regular a expressão de genes clonados.

O ciclo vegetativo do *A. nidulans* consiste na proliferação de hifas, células tubulares, multinucleadas, formadoras de tecido vegetativo denominado micélio. Este organismo é classificado como fungo perfeito, pois possui um ciclo sexual definido (figura 5). Por ocasião da identificação do ciclo sexual em *A. nidulans*, ele foi renomeado como *Emericella nidulans*, no entanto ele permanece sendo chamado de *Aspegillus nidulans*.

Os conídios, estruturas de reprodução assexuada, apresentam um único núcleo estacionado em G1, sendo capazes de se manterem dormentes, porém viáveis por longos períodos de tempo. O conídio germinante passa por uma etapa inicial de incorporação de água, na qual ele cresce isotropicamente pela deposição de novas camadas de parede celular em todas as direções (OSHEROV et al., 2000). A primeira divisão nuclear ocorre depois de aproximadamente 4 horas do início da incorporação de água. Após 8 horas, o conteúdo citoplasmático sofre um aumento de 10 vezes, e o DNA de 8 vezes, ou seja 3 divisões nucleares se completam (DOONAN, 1992). Surge então o tubo germinativo, gerando um eixo polarizado. A deposição de parede celular exclusivamente na ponta do tubo germinativo é chamada de extensão apical, e confere à hifa o aspecto de um filamento alongado (HARRIS, 1997, MONAMY et al., 2000).

A citocinese em fungos filamentosos é estabelecida pela formação de septos que dividem as hifas, tornando-as uma estrutura modular composta por células individuais. Assim, como nos demais eucariotos, a citocinese em *A. nidulans* é coordenada com o ciclo celular, ocorrendo à formação do primeiro septo após a terceira mitose (HARRIS, 1997).

Para induzir o ciclo sexual é necessário reduzir a tensão de oxigênio, através da vedação da placa, observando-se a formação de cleistotécios após 10 dias (Doonan, 1992). *A. nidulans* é homotático, isto é, uma colônia originada de um único conídio é capaz de se autofecundar, realizando o ciclo sexual. O corpo de frutificação deste fungo, ou cleistotécio, é uma estrutura esférica com coloração avermelhada que possui em seu interior cerca de 10 mil asci, cada um contendo 8 ascósporos (esporos sexuais) binucleados (figura 6). Células Hulle são estruturas globulares que recobrem os cleistotécios, cuja função se desconhece.

O desenvolvimento do cleistotécio se inicia a partir de dois núcleos, os quais entram em divisão sincronizada para produzir uma hifa dicariótica precursora do cleistotécio, local onde se acredita ocorrer à fusão nuclear que origina o zigoto diplóide. Seus núcleos sofrem uma divisão meiótica, originando 4 núcleos haplóides, e cada um deles se divide mitoticamente originando 8 núcleos. A parede do ascósporo, denominada cápsula periscopal, se forma ao redor de cada um destes núcleos. Após a individualização dos 8 produtos, seus núcleos sofrem uma divisão mitótica, originando os esporos sexuais binucleados. Quando a fusão nuclear ocorre entre núcleos genotipicamente diferentes, o cleistotécio formado será híbrido. Os ascóporos presentes nestes cleistotécios poderão ser utilizados em análises genéticas.

Além dos ciclos assexual e sexual, *A. nidulans* apresenta ainda um ciclo parasexual, no qual hifas de duas linhagens crescidas lado a lado se fundem, formando o heterocário, um micélio que apresenta os núcleos das duas linhagens. Isto permite o cruzamento experimental de duas linhagens para obtenção de uma progênie recombinante sem a necessidade de ciclo sexual ou da divisão meiótica dos núcleos.

A esporulação do heterocário forma diplóides estáveis, os quais podem ser usados na determinação de recessividade ou dominância de uma mutação, quando o alelo selvagem e o mutado estão presentes no mesmo núcleo. Um diplóide pode perder cromossomos gradativamente como resultado de falhas na separação de cromátides irmãs durante a mitose (“nandisjunction”), voltando à condição haplóide. Este processo pode ser acelerado pelo uso de concentrações subletais do fungicida Benomil, um inibidor do rearranjo dos microtúbulos. O haplóide resultante contém alguns cromossomos de uma linhagem parental, e alguns da outra. Assim é possível localizar uma mutação num determinado cromossomo ou grupo de ligação através

do uso de linhagens com marcadores específicos fenotipicamente em cada um dos grupos de ligação.

Figura 6: Ciclo de vida do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. Extraído e modificado de CASSELTON; ZOLAN (2002).

1.4. A resposta ao dano ao DNA no modelo experimental *Aspergillus nidulans*

O estudo do sistema de reparo ao dano ao DNA em fungos é baseado na caracterização de linhagens mutantes defectivas na resposta ao dano ao DNA. Alguns genes, cujos produtos participam deste sistema, foram identificados através de mutações recessivas causadoras de sensibilidade a agentes genotóxicos. Em *A. nidulans*, 5 coleções de mutantes sensíveis a agentes genotóxicos foram descritas: (i) *uvs*, (ii) *mus*, (iii) *sag*, (iv) *nuv* e (v) *sca*, sendo as duas primeiras as mais estudadas e a última identificada através de resultados prévios obtidos em nosso laboratório mostrando que o gene *scaA*^{NBS1} está envolvido em ambos os pontos de checagem do DNA replicacional e da intra-S. (para uma revisão ver GOLDMAN et. al., 2002 e FAGUNDES et. al., 2005).

Os mutantes *uvs* (“ultraviolet sensitive”) e *mus* (MMS “sensitive mutants”) são hipersensíveis à luz ultravioleta e ao agente alquilante metil metano sulfonato (MMS). A sensibilidade dos mutantes *uvs* a tais agentes foi utilizada como parâmetro para a classificação dos mesmos em quatro grupos epistáticos: *UvsB*^{atr}, *UvsC*^{Rad51}, *UvsF*^{RFC1} e *UvsI*^{REV3L} (KAFFER & MAYOR, 1986; CHAE & KAFFER, 1993). De Souza et al. (1999) sequenciaram os genes *uvsB* e *uvsD*, e encontraram que o *uvsB* faz parte da família das proteínas quinases Atm/Atr/Rad3/Mec1/Tel1, enquanto que o *uvsD* apresentou homologia com o *rad26* de *S. cerevisiae*, o ortólogo de ATRIP em humanos.

Hofman & Harris (2000) demonstraram que a proteína *UvsB*^{ATR} é necessária em vários aspectos da resposta ao dano ao DNA, como a parada do ciclo celular, a inibição da septação e a indução da mutagenese e sugeriram que esta proteína funciona como um regulador central na resposta ao dano ao DNA em *A. nidulans*. Esses mesmos autores observaram, ainda, que a mutação *musN227* (um membro da família das helicases do DNA RecQ) suprime parcialmente a deficiência na resposta ao dano ao DNA provocada pela mutação *uvsB*. Além disso, *UvsB* também regula a expressão do homólogo de NBS1 em *A. nidulans* (FAGUNDES et al., 2005). A clonagem do *uvsC* mostrou que este gene é um homólogo do *rad51* de *S. cerevisiae* (VAN HEEMST et al., 1997). No entanto, diferentemente de seu homólogo de levedura, o *uvsC* não apresentou um papel significativo no sistema de reparo induzido por UV (BABUDRI et al., 1998).

Um homólogo da proteína quinase ATM em *A. nidulans* (*atmA*^{ATM}), foi caracterizada e mostrou ter funções variadas neste organismo. A proteína *atmA*^{ATM}

mostrou similaridade funcional e estrutural ao seu homólogo em humanos relativo a DDR. Entretanto, *atmA*^{ATM} apresentou uma interessante função na manutenção do eixo de crescimento polarizado e na proliferação celular podendo regular a localização de proteínas chaves necessárias nas áreas de crescimento polarizado (Malavazi, 2007).

Os Mutantes pertencentes ao grupo *UvsF*, incluindo *uvsF*, *uvsH* e *uvsJ*, apresentaram algumas características comuns aos mutantes de *E. coli* e de *S. cerevisiae* em relação à deficiência no reparo por NER. Porém, a análise molecular do *uvsH* e do *uvsF* demonstrou que seus produtos são respectivamente homólogos ao *Rad18* de *S. cerevisiae* e ao fator C de replicação do DNA (YOON et al., 1995; KAFER & MAY, 1997), descartando o envolvimento desse grupo epistático em NER (GOLDMAN; MACGUIRE; HARRIS, 2002; GOLDMAN; KAFER, 2004).

Han e colaboradores (1998) sequenciaram o gene *uvsl*, o qual apresentou homologia à subunidade REV3 da polimerase ζ do DNA de *S. cerevisiae*. Estes mesmos autores sugerem que falhas durante a tradução do DNA, causadas pela mutação na subunidade REV3, causam sensibilidade na presença de luz UV nesse organismo.

Na presença de dano no DNA de *A. nidulans* ocorre à ativação do ponto de checagem G2/M pela inativação da *NimX*^{cdc2}, através da fosforilação de sua tirosina 15 promovida pelo ortólogo da *AnkA*^{wee1} (YE et al., 1997). A ativação deste ponto de checagem pelo dano causado ao DNA também inibe a septação através da inativação de *Nimx*^{cdc2}, por um mecanismo ainda desconhecido (HARRIS; KRAUS, 1998; KRAUS; HARRIS, 2001). Apesar das 2 subunidades do complexo promotor da anáfase (APC) terem sido identificadas em *A. nidulans*, a *BimA*^{APC3} e a *BimE*^{APC1}, a participação do APC no ponto de checagem da fase S é dependente do acúmulo de *NimA* na forma ativa (YE et al., 1996, OSMANI; YE, 1997). Surpreendentemente *BimA* demonstrou participar do ponto de checagem G2/M em *A. nidulans* (LIES et al., 1998).

A partir do isolamento da coleção de mutantes *sca*, sensível ao quimioterápico camptotecina, foi possível a identificação do mutante *sca299*, que apresentou alta sensibilidade a esta droga e a outros agentes mutagênicos (BRUSCHI et al., 2001). A proteína identificada *ScaA* mostrou moderada similaridade com a nibrina humana (NBS1) e de camundongo. Recentemente, com o intuito de identificar novas proteínas que pudessem interferir na via metabólica do

complexo em que a proteína ScaA esta normalmente envolvida, foram isolados quinze supressores (*scsA*^{TOP1}). Além disso, foi demonstrada interação sinérgica entre *scaA*^{NBS1} e *scsA*^{TOP1} (FAGUNDES et al., 2003). Adicionalmente, ensaios de duplo híbridos conduzidos por SEMIGHINI et al. (2003) utilizando o cDNA de *scaA*^{NBS1} como “isca” permitiram a clonagem e a caracterização molecular do gene MreA, o homólogo do MRE11 em *A. nidulans*. A ausência do homólogo de RAD50 em *A. nidulans*, *sldI*^{RAD50}, conferiu um fenótipo de maior sensibilidade na presença de agentes que causam dano ao DNA indicando que *sldI*^{RAD50} é responsável pelo reparo e/ou sensoramento causado por agentes mutagenicos como descrito para os outros dois componentes do complexo *scaA*^{NBS1}-*mreA*^{MRE11} mostrando que o complexo MRE11-NBS1-Rad50 tem sua função conservada em *A. nidulans* (BRUSCH et al., 2001; Semighini et al., 2003; MALAVAZI et al., 2005).

O fungo filamentoso *A. nidulans* apresenta um sofisticado sistema de reparo ao dano ao DNA o que o torna um modelo apropriado para o estudo dos mecanismos envolvidos no reparo do dano ao DNA. Neste trabalho, as serina/treonina proteínas quinases ChkA^{Chk1}, ChkB^{Chk2} transdutoras na cascata de sinalização do dano ao DNA em humanos e a proteína homóloga DdbA^{DDB1} envolvida no reconhecimento do dano no DNA causado por luz UV em humanos tiveram especial interesse. Assim, os principais objetivos deste trabalho foram:

- i) o isolamento e a caracterização fenotípica dos mutantes *chkA^{chk1}*, *chkB^{chk2}* e
- ii) a caracterização funcional do gene *ddbA^{DDB1}* em *A. nidulans*.

3.1. As linhagens de *A. nidulans* utilizadas neste trabalho

Tabela 1: Genótipos das linhagens de *A. nidulans* utilizadas neste trabalho

Linhagens	Genótipo	Referência
A4	Glasgow “wild type”	FGSC [§]
GR5	<i>pyrG89 pyroA4, wA3</i>	FGSCA773 [§]
R21	<i>pabaA1; yA2</i>	FGSC [§]
UI224	<i>pyrG89 yA2; argB2</i>	FGSC [§]
JFL9	<i>argB; pyrG89;pyroA; yA2</i>	Este trabalho
TNO2A3	<i>pyrG89 pyroA4; argB2;chaA1; ΔnKuA::argB</i>	NAYAK et al., 2006
AAH14	<i>pyrG89; argB2;pabaA1; yA2; ΔuvsB::argB</i>	HOFFMAN; HARRIS, 2000
IM69	<i>pyrG89 pyroA4, wA1; ΔatmA::pyrG</i>	MALAVAZI et al., 2006
CDS195	<i>PyrG89 pyroA4, histone H2AX-S129; wA3</i>	DE SOUZA et al., 2006
IM72-2	<i>PyrG89; yA2; argB2; ΔcshA::pyrG</i>	MALAVAZI et al., 2006
IM-JFL2	<i>AlcA::GFP::ddbA::pyr4 pyrG89 pyroA4, wA3</i>	Este trabalho
JFL2	<i>pyrG89; ΔddbA::pyrG89; pyroA41</i>	Este trabalho
JFL3	<i>pyroA4 pyrG89; chaA1 argB2; ΔchkA::pyrG</i>	Este trabalho
JFL4	<i>pyroA4 pyrG89, ΔchkB::pyro; wA3</i>	Este trabalho
TNODDB	<i>pyrG89; ΔddbA::pyrG89; pyroA4;argB2; ΔnkuA::argB2</i>	Este trabalho
JFL2-14	<i>pyrG89; ΔddbA::pyrG89;pyroA4;argB2; ΔuvsB::argB2;ya2</i>	Este trabalho
JFL2-69	<i>pyrG89; ΔddbA::pyrG89; ΔatmA::pyrG89; pyroA4;wA3</i>	Este trabalho
JFL2-72	<i>pyrG89; ΔddbA::pyrG89; PyrG89; yA2; ΔcshA::pyrG</i>	Este trabalho
JFL2-195	<i>pyrG89; ΔddbA::pyrG89; histone H2AX-S129</i>	Este trabalho
JFL3-14	<i>pyrG89 yA2; argB2; ΔchkA::pyrG; ΔuvsB::argB</i>	Este trabalho
JFL3-69	<i>pyrG89; chaA1; pyroA1; ΔchkA::pyrG; ΔatmA::pyrG</i>	Este trabalho
JFL4-14	<i>pyrG89 yA2; argB2; pyroA₁; ΔchkB::pyroA; ΔuvsB::argB</i>	Este trabalho
JFL4-69	<i>pyrG89 wA3; pyroA1 ΔchkB::pyroA; ΔatmA::pyrG</i>	Este trabalho
JFL100	<i>pyrG89 yA2; argB2; pyroA1; ΔchkB::pyroA; ΔchkA::pyrG</i>	Este trabalho

[§] Fungal Genetics Stock Center (<<http://www.fgsc.net>>)

3.2. Meios de cultura

3.2.1. Meios de cultura para *A. nidulans*

3.2.1.1 Meio mínimo (MM)

20X solução de sais (Kafer, 1997)	1X
Elementos traços	0,1%
Glicose	1% (p/v)
Agar (Difco)	2% (p/v)

O pH foi ajustado para 6,5. Esterilizou-se em autoclave. Para MM+Glicerol, a glicose foi substituída por 2% de glicerol (v/v).

3.2.1.2. Meio completo (YAG, YUU, YG e YG+UU)

Extrato de levedura	0,5%
Glicose	2% (p/v)
Ágar	2% (p/v)
Solução de elementos Traços	0,1%

O volume final foi ajustado com água destilada. Esterilizou-se em autoclave. YUU indica o meio de cultura completo YAG suplementado com uridina 4 mM e uracila 10 mM. O meio de regeneração dos protoplastos, utilizado na transformação de *A. nidulans* consistiu de meio completo + KCl, ou seja, acrescido de 0,6 M de KCl; Os meios YG e YG+UU são iguais em composição, respectivamente, aos meios YAG e YUU, entretanto sem a adição de ágar 2% (p/v). Para meio Top Agar de regeneração dos protoplastos foi adicionado 1% (p/v) de ágar.

3.2.2. Meio de cultura para *E. coli*

3.2.2.1. Meio Luria Bertani (LB)

Extrato de Levedura	0,5% (p/v)
---------------------	------------

Cloreto de Sódio	0,17 M
------------------	--------

Triptona	1% (p/v)
----------	----------

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e o meio foi esterilizado em autoclave. Para meio sólido foi adicionado 2% (p/v) ágar.

3.3. Soluções tampões

3.3.1. Solução de elementos traços

Sulfato de zinco heptahidratado - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	75 mM
---	-------

Ácido bórico - H_3BO_3	180 mM
--	--------

Cloreto de manganês tetra hidratado - $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	25 mM
---	-------

Sulfato de ferro heptahidratado - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	18 mM
---	-------

Cloreto de cobalto pentahidratado - $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	6 mM
---	------

Sulfato de cobre pentahidratado - $\text{Cu}(\text{SO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	6 mM
--	------

Molibdato de amônio tetra hidratado - $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 mM
--	------

Ácido etileno diamino tetraacético - EDTA	140 mM
---	--------

Os componentes foram adicionados na ordem listada em 1/8 do volume final de água destilada. Cada componente era dissolvido completamente antes da adição do próximo. A solução foi aquecida até 100°C e então resfriada para 60°C. Ajustou-se o pH entre 6,5 e 6,8 com solução de NaOH 10 M. Deixou-se resfriar até atingir a temperatura ambiente para acerto do volume final.

3.3.2. Solução de sais 20X concentrada para MM (Kaffer, 1977)

Nitrato de Sódio (NaNO_3)	3,2 M
--------------------------------------	-------

Cloreto de Potássio (KCl)	0,14 M
---------------------------	--------

Dihidrogenofosfato de Potássio (KH_2PO_4)	0,2 M
---	-------

Sulfato de Magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,04 M
--	--------

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e utilizados na composição do Meio Mínimo.

3.3.3. Solução de protoplastização para transformação em *A. nidulans*

3.3.3.1. Solução 1 de protoplastização

Sulfato de amônio	0,8 M
Ácido cítrico pH 6	100 mM

Dissolveu-se o sulfato de amônio em água destilada e adicionou-se o volume adequado de solução de ácido cítrico 1 M, pH 6 previamente preparado. Ajustou-se o volume e esterilizou-se em autoclave.

3.3.3.2. Solução 2 de protoplastização

Extrato de levedura	1% (p/v)
Sacarose	2% (p/v)

Os componentes foram dissolvidos em água destilada. Esterilizou-se em autoclave.

3.3.3.3. Solução 3 de protoplastização

Sulfato de amônio	0,4 M
Sacarose	1% (p/v)
Ácido cítrico pH 6	50 mM

Sulfato de amônio e sacarose foram dissolvidos em água destilada. Adicionou-se o volume necessário de uma solução de ácido cítrico 1 M, pH 6 previamente preparada. Esterilizou-se em autoclave.

3.3.3.4. Solução 4 de protoplastização

Polietilenoglicol (PEG) PM 6000 g/mol	25% (p/v)
CaCl ₂ .2H ₂ O	100 mM
KCl (Sigma)	0,6 M
Tris HCl pH 7,5	10 mM

Dissolveram-se os componentes em água destilada e acrescentou-se o volume necessário de solução Tris HCl, pH 7,5 (1 M) previamente preparada. Esterilizou-se em autoclave.

3.3.3.5. Solução 5 de protoplastização

CaCl ₂ .2H ₂ O	50 mM
KCl	0,6 M
Ácido 2 (N-morfolino etanosulfônico) (MES) pH 6,0	10 mM

Os componentes foram dissolvidos em água destilada. Esterilizou-se em autoclave.

3.3.4. Solução de lise para mini prep

NaOH	0,2 M
SDS	1%

Preparou-se no momento do uso a partir de soluções estoque de NaOH 4 M e SDS 10%.

3.3.5. Solução de neutralização para mini prep

Acetato de Potássio	3 M
Ácido acético glacial	7,5 ml

Dissolveu-se o acetato de potássio em água destilada e acrescentou-se o ácido acético. Ajustou-se o volume com água destilada para 500 ml e esterilizou em autoclave. Armazenou-se à 4°C.

3.3.6. Solução de Denhardt (100 X concentrada)

Soro albumina bovina (BSA) (Fração V, Sigma)	2% (p/v)
Ficoll tipo 400	2% (p/v)
Polivinilpirrolidona	2% (p/v)

Dissolveu-se o Ficoll e a PVP em água destilada com calor suave. Foi então adicionada a BSA na solução resfriada e ajustou-se o volume adequado. Estocou-se a -20°C.

3.3.7. Solução depurinizante

HCl	0,2 M
-----	-------

O volume necessário de ácido foi diluído em água destilada e o volume final acertado.

3.3.8. Solução salina citrato (SSC) 20X concentrada

Cloreto de Sódio (NaCl)	3 M
-------------------------	-----

Citrato de Sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	300 mM
--	--------

Dissolveu-se em água destilada, ajustou-se em pH 7,0 com NaOH (4 M) e completou-se o volume com água destilada.

3.3.9. Solução SDS 10%

SDS	10 g
-----	------

Água destilada q.s.p.	100 ml
-----------------------	--------

Dissolveu-se em água destilada e acertou-se o volume.

3.3.10. Solução de fixação para microscopia I

Formaldeído	3,7% (v/v)
-------------	------------

NaH_2PO_4	50 mM pH 7,0
---------------------------	--------------

Tween 80	0,2% (v/v)
----------	------------

Dissolveu-se em água destilada. Os germinantes foram tratados por 30 minutos para fixação.

3.3.11. Solução de fixação para microscopia II

PBS	1X
DMSO	5% (v/v)
Formaldeído	3,7% (v/v)
Metanol	10% (v/v)

Dissolveu-se em água destilada. Os germinantes foram tratados por 15 minutos para fixação.

3.3.12. Solução estoque de DAPI

4,6-diamino-2-phenilindol (DAPI)	100 µg/ml
----------------------------------	-----------

Esta solução foi mantida fora do alcance da luz, -20°C.

3.3.13. Solução estoque de cacoflúor

Dissolveu-se o equivalente a 100 µg/ml de calcoflúor (Blankophor BBH, Standard SV-2460, Miles Organic Products Division), em uma gota de KOH 1 M e a seguir adicionou-se o volume adequado de água destilada. A solução foi mantida fora do alcance da luz a -20°C.

3.3.14. Solução estoque de requisitos nutricionais

As soluções estoques de vitaminas e aminoácidos foram preparadas segundo Kafer (1977), como descritas na Tabela 2, sendo esterilizadas por filtração e adicionadas ao meio de cultura autoclavado de maneira estéril.

Tabela 2: Soluções estoque de requisitos nutricionais recomendados para complementação das auxotrofias em *A. nidulans*.

	Solução estoque[§]	Concentração/ 1 L de meio de cultura
Vitaminas		
10X Ác. p-aminobenzóico (PABA)	0,17 g/100 ml H ₂ O	500 µl
biotina	0,03 g/100 ml H ₂ O	100 µl
100X Piridoxina-HCl (PIRO)	0,10 g/100 ml H ₂ O	50 µl
Pirimidinas		
5 mM Uridina	-	1,22 g
10 mM Uracila	-	1,12 g
Aminoácidos		
2X L-Arginina	8,4 g/100 ml H ₂ O	2,5 ml
100 mM L-Citrulina	1,75 g/100 ml H ₂ O	10 ml

[§] Soluções filtradas em filtro 0,45µm (PVDF, Millipore).

3.3.15. Solução estoque das drogas mutagênicas utilizadas

Tabela 3: Soluções estoque das drogas mutagênicas.

Drogas	Mecanismo de ação	Estoque
bleomicina (BLEO)	causa fragmentação do DNA, mimético de radiação gama	3 mg/ml (em água)
camptothecin (CPT)	inibidor da topoisomerase I	0,2 mol/L (em DMSO)
hidroxiuréia (HU)	inibidor da síntese de DNA por depleção de nucleotídeos (inibe a enzima ribonucleotídeo redutase)	3 mol/L (em DMSO)
methyl methanesulfonate (MMS)	agente alquilante do DNA	5% (em água)
paraquat (PARAQ)	indutor de estresse oxidativo	1 mol/L (em água)
menadiona (MENA)	indutor de estresse oxidativo	0,5 mol/L (em DMSO)
4-nitroquinoline oxide (4NQO)	mimetizante de radiação UV	100 µg/ml (em DMSO)
Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	agente oxidante	9,8 mol/L
Sulfato ferroso (FeSO ₄)	metal	1 mol/L
Cloreto de cádmio (CdCl ₂)	metal	1 mol/L
Sulfato de zinco (ZnSO ₄)	metal	1 mol/L

3.3.16. Tampão PBS (“Phosphate buffered saline”) 10X concentrado

NaCl	350 mM
KCl	180 mM
Na ₂ HPO ₄	25 mM
KH ₂ PO ₄	18 mM

Dissolveu-se em água destilada, acertou-se para pH 7,4 e completou-se o volume final para 1L. Esterilizou-se em autoclave.

3.3.17. Tampão MOPS 10X concentrado

3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)	0,2 M
Acetato de sódio	0,5 M
EDTA	0,01 M

Dissolveu-se os componentes em água deionizada tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1% e o pH foi ajustado para 7.

3.3.18. Tampão de amostra para eletroforese de RNA

Azul de Bromofenol	0,1 mg/ml
Glicerol	50% (v/v)
Tampão MOPS	1x

Dissolveu-se os componentes no volume necessário.

3.3.19. Tampão de amostra para eletroforese de DNA

Azul de Bromofenol	0,1 mg/ml
Xileno cianol	0,1 mg/ml
Glicerol	50% (v/v)

Dissolveu-se os componentes no volume necessário.

3.3.20. Tampão TRIS-Acetato-EDTA (TAE) 50X concentrado

Tris Base	242 g
Ácido Acético Glacial	57,1 ml
EDTA 0,5M pH 8,0	100 ml
Água destilada q.s.p.	1 L

Acertou-se para pH 8 e esterilizou-se em autoclave. Para uso na eletroforese de DNA, o tampão foi diluído 1X.

3.3.21. Tampão GET para “mini prep”

Glicose anidra	0,92% (p/v)
EDTA	10 mM
Tris-HCl	26 mM

Dissolveu-se a glicose em água destilada e adicionou-se volume necessário de solução estoque de EDTA (0,5 M, pH 8) e Tris-HCl (1 M, pH 7,4). A solução foi esterilizada em autoclave e as alíquotas estocadas -20°C.

3.3.22. Tampão de extração de DNA

Tris-HCl pH 8,5	200 mM
Cloreto de sódio	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0,5% (p/v)

Dissolveu-se em água destilada.

3.4. Protocolos adotados**3.4.1. Mini preparação do DNA plasmidial**

O protocolo de extração do DNA plasmidial descrito abaixo foi utilizado para o isolamento dos plasmídios pMCB17apx, pCDA21 e pAFPYRO de *E. coli*. Para estabelecimento da cultura pura, os clones de interesse foram inoculados em 1,5 ml

de meio LB para cada poço da placa de cultura, adicionado antibiótico ampicilina (100 µg/ml, concentração final) para a seleção do plasmídeo. A placa foi selada com adesivo, cada poço foi perfurado com uma agulha para prover aeração e incubada em um agitador orbital (300 rpm) a 37°C por 22 a 24 horas. Depois do crescimento, a placa foi centrifugada a 3200 *g* por 6 min para precipitar as células. O adesivo foi removido e o sobrenadante descartado. A placa foi colocada virada para baixo para permitir a secagem por 10 minutos. Ao pellet resultante foram adicionados 240 µl de tampão GTE em cada poço. A placa foi novamente selada e agitada em agitador de placas para a ressuspensão. Esse homogeneizado foi centrifugado por 6 minutos a 3200 *g*, o sobrenadante desprezado e a placa virada por mais 5 minutos para secagem. A cada poço foram adicionados 80 µl de tampão GET e 5 µl de RNase A (Quiagem, Alemanha) na concentração de 10 mg/ml do estoque. A seguir as células foram ressuspensas em agitador de placas, brevemente centrifugadas até a velocidade de 1800 *g* e imediatamente submetidas ao agitador de placas. Desta suspensão, 60 µl foram transferidos para uma nova placa receptora resistente ao calor.

A lise alcalina foi efetuada pela adição de 60 µl da solução de NaOH/SDS fresca em cada poço. A placa foi selada com adesivo e homogeneizada por inversão. Incubou-se a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugou-se até 1800 *g*. Para neutralização foram adicionados 60 µl de acetato de potássio 3 M a cada poço da placa receptora homogeneizando-se novamente por inversão, seguindo-se de incubação a temperatura ambiente por 10 minutos.

Depois de breve centrifugação, o adesivo era retirado e a placa incubada a 90°C por 30 minutos. Após esse tempo, a placa foi resfriada em banho de gelo por 10 minutos e submetida à centrifugação por 5 minutos a 3200 *g* a 20°C. Todo o sobrenadante resultante foi transferido para um sistema de filtração que consistia de uma placa filtro de PVDF (0,2 µm, Corning, USA) colocada sobre uma nova placa de 96 poços fixada com fita adesiva. A filtração retira os debris celulares do lisado. O sistema foi centrifugado por 5 minutos a 3200 *g* a 20°C. Ao filtrado em cada poço era adicionado 110 µl de isopropanol absoluto. A placa foi novamente selada com um novo adesivo e homogeneizada por inversão. Para precipitação do DNA plasmidial a placa foi centrifugada por 45 minutos a 3200 *g* a 20°C. O sobrenadante foi descartado e 200 µl de etanol 70% gelado foram adicionados a cada poço. A placa

foi então selada e centrifugada por 5 minutos a 3200 *g* a 20°C e o sobrenadante descartado. Para acelerar a secagem, a placa foi centrifugada invertida sob papel absorvente por 2 minutos a 130 *g*. A seguir a placa foi seca à temperatura ambiente por 1 hora. Depois disso, o DNA foi eluído adicionando-se 40 µl de água milliQ por poço durante 16 horas. A qualidade do DNA plasmidial foi verificada em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X corado com brometo de etídeo (10 µg/µl) para assegurar a quantidade necessária para a reação de sequenciamento.

3.4.2 Extração de DNA genômico

Para a produção de biomassa de micélio, esporos de linhagens de *A. nidulans* foram inoculados em meio de cultura completo e incubados por aproximadamente 16 horas a 37°C e 250 rpm. Os micélios foram coletados por filtração a vácuo em funil de porcelana e congelados imediatamente em nitrogênio líquido para serem triturados com pistilo e cadinho. Para cada cerca de 40 mg de micélio foram acrescentados 480 µl de Tampão de Extração de DNA. Foi adicionado em cada amostra, um volume igual de fenol:clorofórmio (1:1) e agitado mecanicamente em agitador de tubos por 10 minutos a fim de que ocorresse precipitação de proteínas e quebra das membranas e paredes celulares.

Para sedimentar as proteínas precipitadas e debris celulares as amostras foram centrifugadas a 20800 *g* por 15 minutos. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio para a retirada de resíduos de fenol ou clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a 20800 *g* durante 5 minutos e a fase aquosa superior foi novamente transferida para outro tubo de microcentrífuga onde foi adicionado 0,54 volume de isopropanol para precipitar o DNA. A amostra foi centrifugada a 20800 *g* por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 20800 *g* por 1 minuto. O sobrenadante foi novamente descartado e o resíduo de etanol evaporado na temperatura ambiente por 30 minutos. O sedimento foi ressuspendido em água MilliQ estéril ou TE, estocado a 4°C e quantificado por espectrofotometria quando necessário.

3.4.3. Extração e manipulação de RNA

Conídios das linhagens que teriam RNA extraído foram crescidos por tempos adequados conforme descrito em cada experimento e tratados com drogas quando era necessário. O micélio foi filtrado a vácuo e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para se evitar a degradação do RNA. Com a finalidade de romper a parede celular do fungo, os micélios congelados foram triturados em nitrogênio líquido com auxílio de cadinho e pistilo esterilizados. O RNA foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA), segundo as recomendações do fabricante.

A integridade do RNA total foi verificada em gel de agarose 1,2% sob condições denaturantes, corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV de acordo com Sambrook e Russel (2001), tendo como critério à presença das bandas intactas correspondentes ao RNA ribossomal 28S e 18S, sendo a intensidade da primeira banda cerca de duas vezes maior que a da segunda.

Os RNAs utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real foram tratados com DNase livre de RNase de acordo com Semighini et al., (2002) e a ausência de DNA após o tratamento foi verificada por uma reação de RT-PCR na qual era utilizada sonda fluorescente do gene *tubC* de *A. nidulans*. Amostras com detecção de sinal negativo foram utilizadas para a síntese do cDNA. O tratamento com DNase foi realizado em um volume final de 50 µl, onde contém 1X Buffer (40 mM Tris-HCl pH 7.5 e 6 mM MgCl₂); 2,5 µl de ditioneitol (100 mM, Invitrogen, USA); 1 µl of RNase Out (40 U/µl, Invitrogen, USA), 10 µl de DNase (1 U/µl, Promega, Madison, USA), e 20 µg de RNA alvo. A reação foi incubada a 37°C por 60 minutos, seguindo-se a etapa de purificação pelo método de fenol clorofórmio (1:1) e precipitação do RNA com acetato de sódio 0,3 M por 16 horas a -80°C para aumentar o rendimento.

Para a produção do cDNA foram utilizados 20 µg de RNA total contidos num volume de 6 µl e 1,5 µl de Oligo dTV (100 µM estoque). A mistura foi aquecida a 75°C por 10 minutos, rapidamente centrifugada e acondicionada em gelo. A seguir foram adicionados 5,0 µl de First Strand Buffer (5X, Invitrogen); 2,5 µl de DTT (100 mM, Invitrogen); 2 µl de RNase Out (40 U/µl, Invitrogen); 2,5 µl de dNTP (10 mM cada). O tubo foi aquecido a 42°C por 5 minutos para termostatar a reação e a seguir 1 µl da enzima transcriptase reversa (Superscript II, Invitrogen USA; 200U/µl) foi adicionada. A reação foi incubada a 42°C por uma hora e trinta minutos para síntese.

3.4.4. Southern blot alcalino

O gel de agarose que foi submetido à eletroforese para o fracionamento do DNA foi tratado com HCl 0,25 M por 15 minutos para depurinação. Após este tratamento, o gel foi colocado sobre papel 3MM previamente embebido em NaOH 0,4 M. Sobre o gel foram colocados a membrana de nylon carregada positivamente (Hybond-N⁺, Armesham-Pharmacia, USA) e 3 papéis 3MM do tamanho exato do gel que foram também previamente umedecidos em NaOH 0,4 M. O papel 3MM abaixo do gel estava conectado a um reservatório contendo NaOH 0,4 M. Acima desse bloco foram colocadas várias folhas de papel absorvente e um peso de aproximadamente 0,5Kg (400 cm³/Kg). Um plástico filme foi colocado entre as bordas do gel e do papel 3MM para evitar contato entre o reservatório de NaOH 0,4 M e os papéis acima do gel. Após aproximadamente 8 horas de transferência, o sistema foi desmontado e o filtro de nylon foi lavado em SSC 2X. O DNA foi fixado à membrana utilizando-se a função autocrosslink do aparelho Stratalinker (UV Stratalinker 1800 Stratagene, USA).

3.4.5. Marcação de sonda radioativa

As sondas de DNA que foram utilizadas nos experimentos de “Southern blotting” foram marcadas pelo método de “random primer extension” utilizando-se o kit comercial “Random Primer Labeling System” (Invitrogen, EUA) com [α -³²P]dCTP seguindo-se o protocolo do fabricante. Os nucleotídeos não incorporados na reação da Klenow foram retirados pela passagem da mistura de reação em coluna de Sephadex G50 previamente hidratada em TE. Antes de serem adicionadas à solução de hibridização, as sondas foram desnaturadas por fervura (100°C) por 5 minutos e resfriadas em banho de gelo para evitar renaturação.

3.4.6. Hibridização das membranas de Southern blot

As membranas de nylon foram pré-hibridizadas por 2 horas a 65°C em solução de hibridização adicionada de 5 mg de DNA de esperma de salmão desnaturado. Esta solução contém SSC, cuja alta força iônica maximiza a taxa de ligação da sonda com seu alvo, e solução de Denhardt e SDS, que são utilizados juntamente com o DNA de esperma de salmão para diminuir as ligações não específicas da sonda na membrana. A sonda foi marcada radioativamente sendo acrescentada diretamente à solução de hibridização após sua desnaturação. As

membranas foram incubadas com a sonda a 65°C por aproximadamente 16 horas, sendo então lavadas com SSC 2X acrescido de 0,1% SDS a 65°C por 15 minutos e, em seguida, com SSC 0,2X acrescido de 0,1% SDS. Estas soluções apresentam alta concentração de sais que, juntamente com a alta temperatura, conferem a estringência necessária para retirar a sonda ligada inespecificamente à membrana. As membranas foram finalmente expostas a filmes autoradiográficos (XAR-5 X-Ray, Kodak) em intensificadores e mantidas a -80°C até a obtenção do sinal. O filme de raios-X contém cristais de haletos de prata, os quais são excitados pelas partículas β -radioativas e passam a emitir elétrons. Íons Ag^+ se ligam aos elétrons emitidos, gerando precipitados de átomos de prata, permitindo a visualização do sinal.

3.4.7. Inativação gênica em *A. nidulans* pela técnica “PCR-mediated”

A deleção dos genes utilizando a técnica “PCR-mediated” dispensou a necessidade da subclonagem do gene de interesse em um plasmídeo adequado, bem como a digestão do gene alvo com enzima de restrição apropriada para se inserir o gene de seleção (KUWAYAMA et al., 2002). Em suma, neste procedimento, para a obtenção do cassete de deleção, três PCRs independentes foram realizadas onde se amplificaram respectivamente as regiões flangeadoras 5' e 3' do gene que foi deletado e o gene marcador de prototrofia, no caso, os genes *pyrG* e *pyro* de *Aspergillus fumigatus*. A partir destes três fragmentos independentes foi realizada uma PCR de fusão utilizando os primers mais distais. A técnica de geração de cassetes de deleção mediada por PCR já fora descrita em *S. cerevisiae*, entretanto nesse organismo, regiões flangeadoras de apenas 50 pb já fornecem condições para uma alta taxa de integração homóloga na levedura (BAUDIN et al., 1993). Em *A. nidulans*, por outro lado, tem sido verificada a necessidade de uma região flangeadora maior, de cerca de 1 Kb em cada lado do cassete para permitir maior eficiência de transformação (YANG et al., 2004).

Os primers utilizados na obtenção dos cassetes de deleção para os genes inativados nesse trabalho estão mostrados na Tabela 4. Na nomenclatura dos primers, aqueles com números 1 e 2 indicam que foram usados na amplificação da borda 5' UTR; 3 e 4 para a amplificação da borda 3' UTR, *pyro* indica a amplificação do gene *pyro* a partir do plasmídeo pAFPYRO e *zeo pyr* indica a amplificação do gene *zeo-pyrG* a partir do plasmídeo pCDA21 (CHAVEROUCHE et al., 2000). Este fragmento amplificado, além do gene *pyrG* (aproximadamente 1,9 kb) apresenta

também o gene de resistência a zeocina (*zeo*) o que gera um fragmento de 2417 pb, por isso chamado de *zeo-pyrG*. Vale ressaltar que os primers 2 e 3 são primers quiméricos os quais apresentam homologia parcial com os genes *zeo*, *pyrG* e *pyro* respectivamente. Da mesma forma os primers ZEO, PYR e PYRO também são quiméricos apresentando homologia com as regiões flangeadora 5' e 3' respectivamente. As regiões de homologia estão destacadas na Tabela 4.

Todas as amplificações foram realizadas em um volume final de 50 µl de reação. O DNA genômico da linhagem GR5 de *A. nidulans* (600 ng), foi usado como molde para amplificar a região 5' e 3' que flanqueiam a região aberta de leitura de cada um dos genes de interesse gerando os produtos de PCR cujos tamanhos estão descritos na Tabela 4. Para a amplificação desses fragmentos foi usada a enzima Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). Para as amplificações dos genes *zeo-pyrG* e *pyro* foram utilizados 200 ng do vetor pCDA21, pAFPYRO e a enzima Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), a qual possui atividade revisora 3'-5' exonucleásica.

Cada um dos três produtos da PCR para cada gene a ser deletado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%. As bandas específicas de cada amplificação foram recortadas do gel e purificadas com Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. O cassete de deleção foi gerado a partir da PCR final de fusão realizada com 50 µl de volume total usando quantidades equimolares dos fragmentos independentes purificados 20 pmol dos primers 1 e 4. O volume total da PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% para purificação da banda correspondente ao cassete de deleção.

Para a comprovação da integração do cassete de deleção no locus do gene em questão e confirmação da inativação gênica, foi utilizada a técnica de Southern blot utilizando-se como sonda um fragmento de PCR amplificado a partir do DNA genômico da linhagem GR5 para cada gene.

Tabela 4: Sequência dos primers utilizados para a produção dos cassetes de deleção pela técnica “PCR-mediated”.

Primer	Sequência *	pb
CHK1_1	5'-TAATGCAGAAGGACAACCG-3'	2000
CHK1_2	5'- <u>CTCAGACAGAAT</u> GTTCTTCATTCTTCTTGGGC-3'	
CHK1PYRAF	5'-AGAATGAAGAACATTCTGTTTCGAGAGGAGGC-3'	2417
CHK1PYRAF	5'-AAGAATCAGGTGGAATTCGCCTCAAACAATGC-3'	
CHK1_3	5'- <u>TGAGGCGAATTCC</u> CACCTGATTCTTGATCTTCC-3'	2000
CHK1_4	5'-TGGTATGCATCTTCTGCC-3'	
CHK2_1	5'- CGACATATTTTGCCTCCA -3'	2000
CHK2_2	5'- <u>GTAATCCAGCATCTGATGTCCTCCTTCGTA</u> AATTGCCCGT-3'	
CHK2PYRO-5'	5'-ACGGGCAATTTACGAAAGGAGGACATCAGATGCTGGATTAC-3'	1760
CHK2PYRO-3'	5'-GAATGGGCCCTGATCTTCAATCACAATCAGCTTTTCAGAATTC-3'	
CHK2_3	5'- <u>GAATTCTGAAAAGCTGATTGTGATTGA</u> AGATCAGGGCCCATTC-3'	2000
CHK2_4	5'-TGGCTGTACATCTTGGGAAA-3'	
DDB1P	5'-CCCATTGTTGAATCTCGTGA-3'	2000
DDB2P	5'- <u>CTGAGAATTCCG</u> AAAGTGTCGGATCCCAA-3'	
DDBZEOP	5'-TCCGGACACTTTTC <u>GGAATTCTCAGTCCTGCT</u> -3'	2417
DDBPYRP	5'-GTTACGCCCTGCCGAATTCGCCTCAAACAAT-3'	
DDB3P	5'- <u>TGAGGCGAATTCC</u> GGCAGGGCGTAACTGAAATA-3'	2000
DDB4P	5'-CCAACGTAGAAAGGGCAGA-3'	

*Regiões sublinhadas indicam homologia com os genes *zeo-pyrG* para *ddbA*^{DDB1} e *chkA*^{chk1} e *pyro* para *chkB*^{chk2}
pb indica o tamanho de cada fragmento amplificado

3.4.8. A identificação da deleção do gene *chkA*^{chk1}

Para confirmar a deleção por “Southern blot” utilizamos *HindIII*, uma enzima de restrição que digeri o gene *chkA* da linhagem selvagem nas posições 1029 da região 5' UTR, 4557 da região 3' UTR liberando um fragmento de 3528 pb, sendo que, na linhagem transformada, a enzima *HindIII* digeri o novo fragmento nas posições 1029 da região 5' UTR, 662, 878 e 1114 localizados no cassete *zeo-pyrG* e 5302 na região 3' UTR gerando quatro fragmentos, possuindo 1633 pb, 216 pb, 236 pb, e 2188 pb respectivamente. Um fragmento de 2.000pb marcado radioativamente com [α -³²P] dCTP complementar a região 5' UTR foi utilizada como sonda aonde esse reconheceu os fragmentos de 3528 pb do DNA da linhagem selvagem e 1633

pb do DNA da linhagem mutante $\Delta chkA$ gerados após o uso da enzima de restrição (Figura 8B). Após a exposição do material em filme autoradiográfico, onde o gene *chkA* foi deletado, apareceu uma banda de 3528 pb na linhagem selvagem e outra de 1633 pb na linhagem transformada. A sonda também reconheceu um fragmento de 2 kb que a enzima *HindIII* digeriu na região 5' UTR (Figura 8C).

3.4.9. A identificação da deleção do gene *chkB*^{chk2}

Para confirmar a deleção por “Southern blot” utilizamos *EcoRI*, uma enzima de restrição que digeriu o gene *chkB* da linhagem selvagem nas posições 1819 localizado na região 5' UTR e em outra posição acima de 4596 pb na região 3' UTR, liberando um fragmento ~5,5 kb, sendo que na linhagem transformada, a enzima *EcoRI* digeriu o novo fragmento nas posições 819 da região 5' UTR, 1212 e 1737 localizados na ORF do gene *pyro*, gerando dois fragmentos, um de 2393 pb, outro de 525 pb. Um fragmento de 2.000 pb marcado radioativamente com [α -³²P] dCTP complementar a região 5' UTR foi utilizada como sonda aonde esse reconheceu os fragmentos maiores gerados após o uso da enzima de restrição (Figura 9B). Após exposição do material em filme autoradiográfico, onde o gene *chkB* foi deletado, apareceu uma banda de >4596 pb na linhagem selvagem e outra de 2393 na linhagem transformada. A sonda também reconheceu um fragmento de 2kb que a enzima *EcoRI* digeriu na região 5' UTR (Figura 9C).

3.4.10. A identificação da deleção do gene *ddbA*^{ddb1}

Para confirmar a deleção por “Southern blot” utilizamos *XhoI*, uma enzima de restrição que digeriu o gene *ddbA* da linhagem selvagem nas posições 3.112, 3.787 localizados na ORF do gene e 6.666 da região 3' UTR liberando dois fragmentos de 675 pb e 2.879 pb respectivamente, sendo que, na linhagem transformada, a enzima *XhoI* digeriu o novo fragmento nas posições 2.458, 3.717 localizados no cassete *zeo-pyrG* e 5.460 na região 3' UTR gerando dois fragmentos, um possuindo 1.259 pb e outro de 1.743 pb respectivamente. Um fragmento de 2.000pb marcado radioativamente com [α -³²P] dCTP complementar a região 3' UTR foi utilizada como sonda aonde esse reconheceu os fragmentos maiores gerados após o uso da enzima de restrição (Figura 20B). Após exposição do material em filme autoradiográfico, onde o gene *ddbA* foi deletado, apareceu uma banda de 2.879pb

na linhagem selvagem e outra de 1.743 na linhagem transformada. A sonda também reconheceu um fragmento de 1kb que a enzima *XhoI* digeriu entre as posições 6.666 da região 3' UTR e 7.666 da mesma região (Figura 20C).

3.4.11. Construção de uma linhagem condicional *alcA::gfp::ddbA*

Nesta construção, utilizou-se o vetor pMCB17apx que contém o promotor do gene *alcA* (álcool desidrogenase) de *A. nidulans* fusionado com a proteína fluorescente verde (GFP). Esse plasmídeo permite a fusão N-terminal do gene de interesse sob o controle do promotor *alcA*. O vetor contém o gene *pyr4* de *Neurospora crassa* como marcador auxotrófico em *A. nidulans*. Para a construção, uma sequência de 2000 pb do gene *ddbA* da região 5' UTR (a partir do códon de iniciação) foi amplificada com os primers DDB1STARTXBA1 e DDB1STOPPST1 (Tabela 5) a partir do DNA genômico da linhagem GR5 utilizando platinum Taq DNA polimerase High Fidelit (Invitrogen, EUA). O material amplificado foi purificado e digerido com *XbaI* e *PstI* para clonagem unidirecional no vetor pMCB17apx previamente digerido com as mesmas enzimas. A reação de ligação se processou em 20 µl utilizando-se 1 U de T4 DNA ligase (Invitrogen, EUA). O material ligado foi eletrotransformado em *E. coli* DH10B e inoculado em LB contendo 50 µg/ml de ampicilina. Clones positivos foram testados por análise de digestão e sequenciados para comprovar o ajuste da janela de leitura entre GFP e o gene *ddbA*. O clone identificado, chamado pMCB17apx-ddbA foi transformado na linhagem selvagem GR5 e selecionado para prototrofia de uridina e uracila em meio YAG. A integração homologa do cassete *alcA::gfp::ddbA* foi confirmada por PCR utilizando os primers DDVFW e DDBREV. O primeiro primer tem homologia a uma sequência do gene *gfp* enquanto a segunda tem homologia a uma região “downstream” ao vetor. A linhagem obtida foi denominada IMJFL2.

Tabela 5: Sequência dos primers *ddbA::gfp*.

Primer	Sequência *	kb
DDB1STARTXBA1	5'-GCTCTAGAGCATGTCGTACATTGCGCCAAT-3'	~3,3
DDB1STOPPST1	5'-AACTGCAGCTAATGCAATCTCCTCAACG-3'	
DDBFW	5'-ATGTCGTACATTGCGCCAAT-3'	
DDBREV	5'-CTAATGCAATCTCCTCAACG-3'	

3.4.12. Preparo de células eletrocompetentes de *E. coli*

Uma colônia isolada da linhagem de *E. coli* DH10B foi inoculada em 10 mL de meio de cultura LB, a 37°C e 200 rpm (Innova 4000 - New Brunswick Scientific) por 16 horas. Uma alíquota de 10 mL deste pré-inóculo foi adicionada a 1 L de LB e cultivada a 37°C sob agitação de 250 rpm (Innova 4000 - New Brunswick Scientific), até que a densidade óptica da cultura a 600 nm atingisse 0,4 a 0,5. O frasco da cultura foi resfriado em banho de gelo por 30 minutos e as células foram recuperadas por centrifugação a 3200 *g* a 4°C por 15 minutos. As células precipitadas foram cuidadosamente ressuspensas em 500 ml de água destilada estéril e resfriada a 0°C. As células foram precipitadas por centrifugação e novamente lavadas como descrito anteriormente. Tais lavagens com água promovem a diminuição da força iônica da suspensão de células, o que facilita a entrada do DNA a ser transformado na bactéria. Em seguida, as células são equilibradas em 10 mL de solução de glicerol 10% (v/v) resfriada a 0°C e centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente. O precipitado foi ressuspenso em glicerol 10% (v/v) com volume necessário para atingir uma concentração de 1 a 3×10^{10} células/ml (aproximadamente 40 μ l de suspensão de células). A suspensão de células eletrocompetentes foi alíquotada em pequenos tubos e estocada a -80°C até o momento do uso.

3.4.13. Eletrotransformação de *E. coli*

O DNA plasmidial dialisado por 1 hora em membrana com poros de 45 μ m (Millipore) foi acrescentado a $4-12 \times 10^8$ células eletrocompetentes da linhagem DH10BF', e homogeneizados gentilmente. A mistura foi transferida para cubetas de eletroporação (Biorad) previamente resfriadas a 0°C e submetida a 25 μ F, 200 ω e 2,5 kV no aparelho Gene Pulser (Biorad, USA). A seguir, 1 ml de meio LB foi adicionado à mistura, transferindo-se para tubos de ensaio estéreis e incubando-se a 37°C e 200 rpm de agitação. Após uma hora, a cultura foi semeada em LB sólido acrescido de 100 μ g/ml de ampicilina e incubada a 37°C por aproximadamente 16 horas.

Foram adicionados ao meio LB sólido IPTG (isopropylthio- β -D-galactosídeo) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo) para transformação de plasmídeos que apresentam a propriedade de alfa complementação do gene da β -galactosidase (*lacZ*). Na ausência de alfa complementação as colônias

recombinantes apresentavam coloração branca. Todos os passos descritos foram feitos de maneira asséptica e em baixa temperatura, o que aumenta a eficiência da eletrotransformação (SAMBROOK, RUSSEL, 2001).

3.4.14. Transformação em *A. nidulans*

A transformação de diferentes linhagens de *A. nidulans* seguiu a metodologia descrita por Osmani et al., (1987). Em particular, nesta etapa do trabalho foi utilizada para as transformações a linhagem TNO2A3. Esta linhagem foi cedida ao laboratório pelo Dr. B. R. Oakley e se trata de um mutante cujo gene *ku70* de *A. nidulans* (*nkuA*) está inativado (NAYAK et al., 2006). Como se sabe os produtos dos genes *ku70* e *ku80* são essenciais para o processo de “non homologous end joining” (NHEJ) no reparo do material genético. A exemplo do que foi verificado inicialmente para *Neurospora crassa* (NINOMIYA et al., 2004), a inativação do gene *ku70* leva a ruptura do sistema de NHEJ e todo o DNA exógeno introduzido na célula durante o processo de transformação é direcionado para a via de recombinação homóloga, o que aumenta consideravelmente a eficiência da transformação e a inserção do cassete de deleção no locus do gene de interesse (Oakley, dados não publicados).

Os mutantes obtidos a partir da linhagem TNO2A3 (*pyroA4 pyrG89; chaA1; ΔnkuA::argB*) foram retrocruzados com a linhagem selvagem UI224 (*argB; pyrG89; yA2*) ou JFL9 (*argB; pyroA₁; pyrG89; yA2*) para o isolamento de segregantes sem o “background” genético do gene *nkuA* para as futuras análises e caracterizações fenotípicas dos genes inativados nesta linhagem.

Um inóculo de aproximadamente 10^7 conídios da linhagem a ser transformada cresceu a 37°C por 16 horas em 50 ml de meio YG acrescido de suplementos apropriados. Os tubos germinativos foram coletados e, em seguida, ressuspensos na seguinte solução de protoplastização: 20 ml de Solução 1 de Protoplastização, 20 ml de Solução 2 de Protoplastização, 6,5 ml de Sulfato de Magnésio 1 M, 400 mg de BSA (Sigma) e 300 mg de Glucanex (Novo Nordisk Ferment). A enzima Glucanex apresenta uma mistura de atividades, incluindo glucanase, quinase e protease, utilizada na digestão da parede celular dos tubos germinativos, na presença do estabilizador osmótico BSA.

Os protoplastos são obtidos após aproximadamente 5 horas de leve agitação (100 rpm) a 30°C, sendo então separados dos restos celulares por filtração em algodão de vidro estéril. Os protoplastos foram coletados por centrifugação a 2200 g

por 10 minutos, e lavados duas vezes com Solução 3 de Protoplastização gelada para se retirar o excesso de enzima. Para equilibrar osmoticamente os protoplastos, os mesmos foram ressuspensos em 1ml de Solução 5 de Protoplastização, e incubados no gelo por 10 minutos. Adicionou-se entre 4-20 µg do DNA a 100 µL de protoplastos, usando-se 50 µL da Solução 4 de Protoplastização contendo PEG que possivelmente promove a fusão das membranas dos protoplastos. O DNA entra no protoplasto na forma de um precipitado de cálcio, também presente na Solução 4, provavelmente através de transporte vesicular. Após incubação em gelo por 20 minutos, mais 1ml da Solução 4 de Protoplastização é adicionado, com posterior incubação a temperatura ambiente por 20 minutos. A suspensão de protoplastos foi transferida para 30 ml de Meio Completo Top Agar acrescido de KCl e semeada em Meio de Regeneração a 37°C, até o aparecimento de colônias transformantes.

3.4.15. Reação de PCR quantitativo em tempo real (“Real time RT-PCR”)

O Kit Taq-Man® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e o Kit Taq-Man® EZ RT-PCR (Applied Biosystems) foram utilizados nas reações de PCR e RT-PCR em tempo real respectivamente, segundo as instruções do fabricante. Os primers e sondas fluorescentes usados neste trabalho foram desenhados através do software Primer Express 1.5 (Applied Biosystems) e estão descritos na Tabela 6.

As condições de termociclagem para reações de PCR em tempo real compreendem um passo inicial a 50°C por 2', seguido de 10' a 95°C e 40 ciclos de 15'' a 95°C e 1' a 60°C. Para reações de RT-PCR, um passo para a transcrição reversa (60°C por 30 minutos) foi acrescentado entre os tempos de 2' a 50°C e 10' a 95°C. A quantidade inicial do número de cópias dos genes de interesse utilizada na construção da curva padrão foi determinada através de duas considerações: (i) o *A. nidulans* é um organismo haplóide e, portanto os genes investigados são representados uma única vez em seu genoma e (ii) considerando-se o tamanho do genoma de *A. nidulans* igual a 30 Mb, um genoma corresponde à aproximadamente 30×10^{-15} g. Teoricamente, cada 30 fg de DNA genômico de *A. nidulans* apresenta uma cópia de cada um dos genes desse fungo. Diluições seriadas de 1 a 10^7 cópias do genoma da linhagem selvagem R21 foram utilizadas para construir as curvas padrões para cada gene investigado. A equação da reta obtida para cada curva padrão, bem como seu respectivo coeficiente de correlação (r^2) foram obtidos em cada experimento. A análise da expressão dos genes de interesse foi feita a partir

do RNA total tratado com DNase obtido nas condições indicadas em cada experimento. As possíveis variações na concentração inicial de RNAm entre as amostras foram calculadas através da normalização com um gene constitutivamente expresso, neste caso, o gene da tubulina C (AN6838.2) (*tubC*) de acordo com Semighini et al. (2002). O aparelho para detecção imediata da fluorescência utilizado nos experimentos de PCR e RT-PCR em Tempo Real foi o ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Tabela 6: Descrição dos primers utilizados nas reações de RT-PCR em Tempo Real.

Identificação	Sequência	Gene
CHK1_An672RL	5'-CGGAAGCTATCCCAAGGTGTATTTTC[FAM]G-3'	AN5494.3
CHK1_672RL/65FU	5'-AGACATCTGGTCGTGTGGCATT-3'	
An_CHK2_820RL	5'- CGGCCAAGACTCGATACTGCTGC[FAM]G -3'	AN4279.3
An_CHK2_820RL768FU	5'- TGACGAGGTGACCGTATTGGAC -3'	
AN_DDB_1162FL	5'-CACTGGACCTCGGAAACCGTACCAG[FAM]G-3'	AN0596.3
AN_DDB_1162FL_1206RU	5'-CGAAAGCTCCAGAGCCAGTG-3'	
tubC_525FL	5'-CACTTAATGCCGTCGCCGAAAG5G-3'	
tubC_525FL_583RU	5'-GCAGAATGTCTCGTCCGAATG-3'	

3.4.16. A análise da expressão de RNAm na presença do dano ao DNA causado por luz UV

Um inóculo de aproximadamente 2×10^{11} conídios da linhagem selvagem GR5 cresceu a 37°C por 4,5 horas em 400 ml de meio YUU líquido e 250 rpm. Após 4,5 horas os esporos foram centrifugados a 10000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi então descartado e os esporos foram igualmente espalhados em placa de Petri e expostos na dose de 500J/m² de luz UV. Após a exposição à luz UV, os conídios cresceram em meio YUU líquido por 20, 60 120 e 150 minutos. As amostras foram então filtradas utilizando o filtro Whatman numero 1 e congelados rapidamente em nitrogênio líquido para extração do RNA total. O RNA total foi extraído pelo método Trizol descrito por Sambrook et al, (1989). O RNA total foi quantificado por espectrofotometria e 10 µg de cada amostra foi submetida à reação de PCR quantitativo em tempo real ("Real time RT- PCR") como descrito no item (3.5.13). Utilizando-se a equação da reta de cada conjunto de primers, foi possível calcular o valor exato do número de cópias transcritas deste gene em cada tratamento. Para a

obtenção do desvio padrão foi realizado para cada tratamento quatro reações de RT-PCR em tempo real.

3.4.17. Análise da expressão de RNAm na presença de agentes mutagênicos

Um inóculo de aproximadamente 10^7 conídios da linhagem GR5 cresceu a 37°C por 16 horas em 50 ml de meio YG e 250 rpm. Após 16 horas o meio de cultura foi substituído por novo meio YG na ausência e na presença de: 25 μ M de CPT, 0,5 μ g de 4NQO, 0,003% de MMS, e 0,6 μ g/ml de Bleo por 30, 60, 120, e 240 minutos. As amostras foram então filtradas utilizando o filtro Whatman numero 1, lavados com água esterilizada e congelados rapidamente em nitrogênio líquido para extração do RNA total. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria e 10 μ g de cada amostra foi submetida à reação de PCR quantitativo em tempo real (“Real time RT-PCR”) como descrito no item (3.4.15). Utilizando-se a equação da reta de cada conjunto de primers, foi possível calcular o valor exato do número de cópias transcritas deste gene em cada tratamento. Para a obtenção do desvio padrão foi realizado para cada tratamento quatro reações de RT-PCR em tempo real.

3.4.18. Análise da expressão de RNAm na presença de agentes que causam estresse oxidativo

Como no item anterior, aproximadamente 10^7 conídios da linhagem GR5 foram inoculados a 37°C por 16 horas em 50 ml de meio YG e 250 rpm. Após 16 horas o meio de cultura foi substituído por novo meio YG na ausência e na presença de: 2, 10 e 40 mM de H_2O_2 e 5 mM de Menadione e Paraquat por 60 minutos para a análise da expressão de *ddbA* e 5, 25 e 100 mM de H_2O_2 , 0,1 e 0,5 mM de Menadiona, 5 e 10 mM de Paraquat, 0,25 e 0,5 mM Fe_2SO_4 , 0,1 e 0,2 mM $CdCl_2$, e 0,1 e 0,25 mM $ZnSO_4$ por 60 minutos para a análise da expressão dos genes *chkA* e *chkB*. As amostras foram então filtradas utilizando o filtro Whatman numero 1, lavados com água esterilizada e congelados rapidamente em nitrogênio líquido para extração do RNA total. O RNA total foi extraído pelo método Trizol descrito por Sanbrook et al, (1989). O RNA total foi quantificado por espectrofotometria e 10 μ g de cada amostra foi submetida a reação de PCR quantitativo em tempo real (“Real time RT-PCR”) como descrito no item (3.4.15). Utilizando-se a equação da reta de cada conjunto de primers, foi possível calcular o valor exato do número de cópias

transcritas deste gene em cada tratamento. Para a obtenção do desvio padrão foi realizado para cada tratamento quatro reações de RT-PCR em tempo real.

3.4.19. Análise da expressão de RNAm durante o desenvolvimento assexual de *A. nidulans*

Para análise da expressão do RNAm *ddbA* durante o desenvolvimento assexual, a linhagem selvagem GR5 foi inoculada em YG acrescido de uridina e uracila a 30°C por 16 horas. O micélio foi então transferido para placas de Petri contendo YAG+UU e incubados a 30°C por 2, 3, 4, 5, 6, e 8 horas respectivamente. Após cada tempo a massa micelial foi suspensa em água estéril, filtrada e congelada em nitrogênio líquido para extração no RNA total. O RNA total foi extraído pelo método Trizol descrito por Sanbrook et al, (1989). O RNA total foi quantificado por espectrofotometria e 10 µg de cada amostra foi submetida à reação de PCR quantitativo em tempo real (“Real time RT- PCR”) como descrito no item (3.4.15). Utilizando-se a equação da reta de cada conjunto de primers, foi possível calcular o valor exato do número de cópias transcritas deste gene em cada tratamento. Para a obtenção do desvio padrão foi realizado para cada tratamento quatro reações de RT-PCR em tempo real.

3.4.20. Análise da expressão de RNAm durante o desenvolvimento sexual de *A. nidulans*

Para analisar a expressão dos genes *chkA*, *chkB* e *ddbA* durante o desenvolvimento sexual, a linhagem selvagem GR5 cresceu em YUU líquido a 30°C por 18 horas. O micélio foi então transferido para placas de Petri contendo YAG + UU, vedadas com fita adesiva e incubados a 30°C por 12, 24, 48, 72, 96, e 120 horas. Após cada tempo a massa micelial foi coletada das placas e congelada em nitrogênio líquido para extração do RNA total. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria e 10 µg de cada amostra foi submetida à reação de PCR quantitativo em tempo real (“Real time RT- PCR”) como descrito no item (3.4.15). Utilizando-se a equação da reta de cada conjunto de primers, foi possível calcular o valor exato do número de cópias transcritas deste gene em cada tratamento. Para a obtenção do desvio padrão foi realizado para cada tratamento quatro reações de RT-PCR em tempo real.

3.4.21. Análise das linhagens que apresentam fusão com GFP

Para a visualização de fluorescência na linhagem *alcA::gfp::ddbA* (IMJFL2), 1×10^4 conídeos foram crescidos por 12 horas a 30°C em 2 ml de MM + glicerol + etanol 2% em placas de cultivo do tipo “glass botton dishes” (Mattek Corporation, USA). Após esse período, quando necessário às células foram tratadas com 0,3 µg/ml 4-NQO para induzir o dano ao DNA e a formação do foco nuclear. Para os experimentos de co-localização as células foram submetidas à fixação por 10 a 15 minutos com solução de fixação II e coradas com DAPI como descrito anteriormente. As células foram igualmente analisadas em temperatura ambiente em microscópio confocal Leica TCS SP5 Laser Scanning Confocal Microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) no Laboratório de Microscopia Confocal, Faculdade de Medicina da Riberião Preto, USP usando objetiva de 63X com imersão em água e utilizando os canais de laser 405 nm para DAPI e 488 nm para GFP. As imagens foram capturadas pela aquisição direta com “Z step” variando de 0,5 a 2 µm através do programa LAS AF (Leica Microsystems). Processamentos adicionais nas imagens e a montagem dos painéis foram realizadas com auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, CA).

3.4.22. Cruzamentos entre linhagens mutantes de *A. nidulans*

As linhagens com auxotrofias contrastantes a serem cruzadas foram inoculadas lado a lado em meio completo adicionado de suplementos adequados e incubadas a 30°C até que o crescimento das duas linhagens se encontrasse. A região de anastomose das hifas contendo os heterocários foi recortada e transferida para placas contendo meio mínimo, onde apenas os heterocários são capazes de crescer (PONTECORVO, 1953). Para os experimentos de indução do ciclo sexual, a placa contendo os heterocários foi selada com fita adesiva para reduzir a tensão de oxigênio. Após incubação por cerca de 10 dias a 30°C, os cleistotécios foram isolados com o auxílio de estereomicroscópio e limpos em uma placa de Petri contendo agar 4% (p/v) estéril em água. Este passo remove os conídios e as células Hülle aderidos à parede dos cleistotécios. Os cleistotécios foram rompidos em microtubos contendo água, a fim de se liberar os ascosporo. Os cleistotécios híbridos foram selecionados através da identificação dos marcadores genéticos das linhagens parentais nas colônias resultantes do crescimento da suspensão de ascosporo, chamadas de segregantes meióticos. Um marcador de fácil visualização

que permite a seleção dos cleistotécios híbridos é a coloração dos segregantes meióticos, mas também as marcas auxotróficas esperadas após o cruzamento.

3.4.23. Determinação do percentual de sobrevivência após exposição à luz UV

Para analisar a diferença de comportamento dos conídios quiescentes e germinantes em *A. nidulans* quando expostos a diferentes intensidades de luz UV, aproximadamente 200 conídios das linhagens, selvagem e do mutante analisado, foram inoculados em YUU. Para conídios quiescentes, as linhagens foram expostas a luz UV logo após serem inoculadas nas doses de 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 J/m² utilizando o UV Stratalinker 1800 com a lâmpada “NEVER LOOK INTO THE BURNING LAMP” FG8T5 JAPAN (Stratagene, La Jolla, CA) e uma placa controle não foi exposta à luz UV. Após a exposição, todas as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias que apresentaram crescimento foram então contadas e comparadas com a placa controle determinando um percentual. Para conídios germinantes, a mesma quantidade de esporos foi inoculada. Depois de inoculados os conídios foram incubados a 37°C por 4,5 horas. 4,5 horas depois, os conídios foram expostos à luz UV, nas mesmas doses citadas anteriormente, e incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias que apresentaram crescimento foram então contadas e comparadas com a placa controle. Foram feitos 3 experimentos independentes para cada linhagem e a diferença foi determinada por análise estatística.

3.4.24. Determinação da sensibilidade a agentes mutagênicos

Diferentes concentrações das drogas indicadas nos experimentos foram adicionadas ao meio completo acrescido de suplementos. Colônias jovens das linhagens a serem testadas foram inoculadas pontualmente com auxílio de palitos esterilizados, bem como as linhagens selvagens adequadas usadas como controle. As placas foram incubadas a 37°C e os fenótipos das linhagens testadas foram confirmados após 3 dias. Para os experimentos quantitativos, o diâmetro radial das colônias em cada concentração de droga utilizada era medido e o valor expresso nos gráficos como valor percentual de redução em relação a linhagem selvagem controle. A fim de se eliminar a possibilidade de inibição do crescimento devido ao solvente DMSO, um controle com DMSO foi realizado para cada experimento. Este

controle consiste em uma placa contendo o solvente DMSO acrescentado na mesma proporção que o maior volume de solução estoque de droga usado. As imagens foram obtidas pela captura da imagem por câmera CCD e os painéis foram montados usando os recursos do programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, CA).

3.4.25. Determinação da funcionalidade do ponto de checagem intrafase S (Ensaio de Mitose)

Cerca de 10^6 conídios foram inoculados em meio completo acrescido dos suplementos necessários bem como 0,06 e 0,1 mol/L de HU a 37°C. A incubação estendeu-se por um período de 4 a 6 horas dependendo da cinética de divisão nuclear da linhagem em questão, de forma a obter-se semelhança nas taxas de divisão nuclear entre as cepas. As amostras foram coletadas após a incubação para a determinação do percentual de germinantes que não bloquearam o ciclo celular na fase S por ocasião do estresse replicacional e dano ao DNA causado pela HU. Conídios que apresentavam mais um núcleo foram contados por terem rompido o bloqueio intrafase S. Foram analisados 100 núcleos em cada experimentos e os resultados apresentados representam médias e desvios padrões de 4 experimentos independentes.

3.4.26. Determinação da polarização do crescimento em conídeos

Incubou-se cerca de 10^4 conídios das linhagens pertinentes a 37°C por 5 horas em meio completo acrescido dos suplementos necessários e 50 mol/L de HU. Após o tempo de sincronização dos germinantes na fase S, os mesmos foram lavados para a retirada da droga com os meios adequados, pré-aquecidos a 37°C, sendo então re-incubados. Foram retiradas amostras dos germinantes nos tempos de 0, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos após liberação do bloqueio com HU. Os germinantes foram fixados, corados com DAPI e calcoflúor e observados em microscópio de fluorescência sob luz ultravioleta e em campo claro com contraste de fase. Foram considerados conídios que apresentaram crescimento polarizado aqueles que mostravam protuberância (HARRIS, 1999) na superfície do esporo que o retirava da sua forma redonda característica. Foram analisados 100 germinantes

em cada experimento e os resultados apresentados indicam médias e desvios padrões de pelo menos cinco experimentos independentes.

3.4.27. Estoque de linhagens

As linhagens de *A. nidulans* utilizadas neste trabalho foram estocadas em sílica estéril a temperatura ambiente, de acordo com a metodologia descrita pelo Fungal Genetics Stock Center (<http://www.fgsc.net/methods/fgscpres.html>). As linhagens de bactérias foram estocadas em glicerol 40% a -80°C, de acordo com Sambrook e Russel (2001).

3.4.28. Análise estatística

A fim de verificar diferenças entre o comportamento das linhagens de *A. nidulans* submetidas ao experimento de viabilidade dos quiescentes e germinantes após irradiação com luz ultravioleta, utilizou-se o teste ANOVA fator único, com $\alpha=0,05$ utilizando-se o programa de análise estatística Sigma Stat 3.1 (Systat Software, Inc., USA). Diferenças de média significantes apontadas pelo teste ANOVA foram identificadas pelo teste Student Newman-Keuls de comparação múltipla (Sigma Stat 3.1; Systat Software, Inc., USA).

4.1. Módulo 1: Isolamento e caracterização fenotípica dos mutantes $\Delta chkA^{CHK1}$ e $\Delta chkB^{CHK2}$ em *A. nidulans*.

4.1.1. A identificação dos genes *chkA*^{CHK1} e *chkB*^{CHK2} de *A. nidulans*

As proteínas serina-treonina quinases CHK1 e CHK2 (“checkpoint kinase” 1 e “checkpoint kinase” 2, respectivamente), foram primeiramente identificadas em *S. pombe* como essenciais para o bloqueio do ciclo celular antes da mitose em resposta ao dano ao DNA ou em resposta ao estresse replicacional. Essas quinases são fosforiladas pelas quinases ATM e ATR respectivamente e possivelmente sofrem autofosforilação potencializando a fosforilação de alvos “downstream”. Essas quinases foram também identificadas em vertebrados pela homologia com as quinases de *S. pombe*. Por exemplo, ratos deficientes em CHK1 apresentam letalidade embriônica, sugerindo que a exemplo de ATM quinase, CHK1 desempenha um papel em todos os pontos do ciclo celular (NIIDA; NAKANISHI, 2006). Entretanto, ao contrário de CHK1, CHK2 parece ser dispensável para o desenvolvimento pré-natal em ratos. Em humanos, tem sido verificado que um grupo de pacientes portadores da Síndrome de Li-Fraumeni apresenta uma mutação heterozigota no gene *chk2*, sem nenhuma mutação no gene *p53* evidenciando a função de CHK2 na via de sinalização e reparo ao dano ao DNA.

Em *A. nidulans* não são conhecidas as funções de CHK1 e CHK2. Essas proteínas atuam abaixo das quinases ATM e ATR, as quais tem sido extensivamente caracterizadas nesse organismo modelo, tendo sido a ATM (*atmA*) recentemente isolada. Diante disso, a construção de mutantes nulos para os genes *CHK1* e *CHK2* de *A. nidulans* pode auxiliar no entendimento do mecanismo de transdução do sinal para o reparo ao dano ao DNA neste organismo. Além disso, mediante ao severo defeito de polarização observado no mutante $\Delta atmA^{ATM}$ é importante entender se esse defeito também é dependente das quinases CHK1 e CHK2 de *A. nidulans* ou se esta característica fenotípica se manifesta a partir de um via metabólica independente do eixo ATM/CHK2 e ATR/CHK1.

A conclusão do sequenciamento do genoma do fungo *A. nidulans* (<<http://www.genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>>) proporcionou facilidades no sentido de tornar possíveis estudos sistemáticos que utilizem este fungo como modelo para o estudo do reparo ao dano ao DNA. Recentemente, a partir do banco de dados do projeto genoma de *A. nidulans*, Goldman e Kafer (2004), realizaram uma compilação dos genes envolvidos no reparo do DNA. Nesta lista,

foram identificados os genes homólogos de *CHK1* e *CHK2* denominado a partir deste trabalho como *chkA*^{CHK1} e *chkB*^{CHK2}, respectivamente.

Os homólogos em potencial de ChkA (AN5494.3) e ChkB (AN4279.3) são proteínas preditas de 534 e 648 aminoácidos que possuem homologia significativa com as proteínas CHK1 e CHK2 de *Homo sapiens* (e-value 7e-46 e 2e-63; 47 e 55% similaridade; 30 e 36% identidade). O sítio ativo serina-treonina quinase dos genes *chkA* e *chkB* está localizado entre os resíduos 395-407 e 139-151 para *chkA* e *chkB* respectivamente. Há também um único motif FHA (“fork head associated”) no gene *chkB* localizado entre os resíduos 186-238.

A partir da sequência dos genes, uma análise filogenética foi feita para determinar uma relação evolutiva das proteínas ChkA e ChkB em diferentes organismos. Os resultados obtidos mostraram que as proteínas ChkA e ChkB estão em um clado que pré-divergiu durante a evolução das outras espécies de *Aspergillus* estando distintos dos mamíferos (Figura 7A e B).

A **B**

Figura 7: A análise filogenética das proteínas ChkA e ChkB. **(A)** Análise filogenética da proteína ChkA. **(B)** Análise filogenética da proteína ChkB. As análises foram feitas usando o programa MEGA-2 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 3.1) software (2001; <http://www.megasoftware.net>). As seqüências foram alinhadas no dendograma e determinadas pelo uso do ClustalX e o método Neighbor-Joining, respectivamente (SAITOU; NEI, 1987; THOMPSON et al., 1997). Uma análise “bootstrap” (FELSENSTEIN 1985) foi feita (1025 repetições) para avaliar a topologia da árvore filogenética.

4.1.2. A inativação dos genes *chkA*^{CHK1} e *chkB*^{CHK2} de *A. nidulans*

Para caracterização dos genes *chkA* e *chkB* uma deleção da ORF (“open reading frame”) foi gerada. Para produção do cassete de deleção foi utilizada a técnica “PCR- mediated” (KUWAYAMA et al. 2002). Foram amplificados 2000 pb na região 5’ “upstream” à ORF (seqüência genômica) e 2000 pb da região “downstream” à ORF (seqüência genômica) de ambos os genes. O gene *zeo-pyrG* de *A. fumigatus* (amplificado a partir do plasmídeo pCDA21) foi utilizado como marcador da deleção do gene *chkA* (Figura 8A), no entanto, para deleção do gene *chkB* utilizamos a mesma estratégia, porém, o gene *pyro* de *A. fumigatus* foi utilizado como marcador auxotrófico (amplificado a partir do plasmídeo pAFpyro) (Figura 9A).

O cassete de deleção foi obtido pela PCR de fusão desses três fragmentos utilizando-se os “primers” distais CHK1-1 e CHK1-4 para deleção do gene *chkA* e CHK2-1 e CHK2-4 para deleção do gene *chkB*, respectivamente. Os fragmentos resultantes da PCR de fusão dos três fragmentos isolados para cada gene (6417 pb para *chkA* e 5760 para *chkB*) foram transformados independentemente na linhagem TNO2A3, auxotrófica para uridina/uracila e pirodoxina o que possibilitou a seleção dos transformantes para independência de uridina/uracila e pirodoxina.

Para cada uma das deleções foram escolhidos 10 candidatos que cresceram em meios seletivos na ausência de uridina, uracila e pirodoxina. Para comprovação da integração homóloga do cassete de deleção, o DNA genômico foi extraído e analisado por “Southern blot” (Figura 8C e 9C). A integração homóloga de cada cassete de deleção nos *loci chkA* e *chkB* aconteceu em vários candidatos e um deles para cada deleção foi selecionado para caracterização fenotípica neste trabalho e foram denominados como JFL3 (*chkA*) e JFL4 (*chkB*).

A **B** **C**

Figura 8: A construção da linhagem mutante $\Delta chkA^{CHK1}$. **(A)** Estratégia utilizada para deleção do gene *chkA* **(B)** Estratégia utilizada para a comprovação da inativação gênica por Southern blot. O DNA genômico da linhagem selvagem e dos candidatos foram extraídos e clivados com a enzima *HindIII*. Um fragmento de 2000 pb foi usado como sonda. Esse fragmento reconhece duas bandas de aproximadamente 2000 e 3528 pb na linhagem selvagem e duas bandas de aproximadamente 2000 e 1623 pb na linhagem mutante. **(C)** A linhagem mutante $\Delta chkA$ foi inicialmente obtida no “background” genético da mutação $\Delta nkuA$ (ver materiais e métodos para detalhes) e o transformante $\Delta chkA; \Delta nkuA$, verificado por Southern blot, foi cruzado com a linhagem selvagem UI224 para eliminar a mutação $\Delta nkuA$. O Southern blot mostrado se refere à comprovação da deleção $\Delta chkA$ após o cruzamento.

4.1.3. A participação dos genes *chkA*^{CHK1} e *chkB*^{CHK2} na resposta celular ao dano ao DNA

Duas abordagens foram testadas para o início do estudo da função dos genes *chkA* e *chkB* na resposta celular ao dano ao DNA em *A. nidulans*: (i) a verificação do crescimento radial das linhagens mutantes na presença de agentes que causam dano ao DNA; (ii) e as alterações na expressão do desses genes na presença de agentes que causam dano ao DNA. Esse segundo item foi verificado por RT-PCR em tempo real.

No primeiro passo, as linhagens mutantes $\Delta chkA$ e $\Delta chkB$ cresceram na presença de diferentes agentes mutagênicos (HU, CPT, 4NQO e MMS). E como podemos observar, na figura 10, o mutante $\Delta chkA$ apresentou alta sensibilidade à droga HU, enquanto que o mutante $\Delta chkB$ não apresentou nenhuma sensibilidade na presença destes agentes.

Figura 10: A sensibilidade dos mutantes $\Delta chkA$ e $\Delta chkB$ a drogas que causam dano ao DNA. As linhagens cresceram por 48 horas na presença e na ausência de HU, CPT, 4NQO, e MMS em meio completo.

Para a verificação do segundo teste, a linhagem selvagem GR5 foi crescida por 16 horas na ausência de drogas e após esse tempo, o micélio foi transferido para meio de cultura contendo as drogas nas concentrações indicadas por 30, 60, 120 e 240 minutos. O RNA total foi isolado e a análise da expressão gênica verificada (Figura 11).

A expressão do gene *chkA* mostrou-se elevada por cerca de doze vezes após 240 minutos de crescimento na presença de MMS; até cinco vezes após 120 minutos de crescimento na presença de bleomicina; e até quatro vezes após 120 minutos de crescimento na presença de 4NQO (Figura 11A). Assim como ocorreu com o gene *chkA* a expressão de *chkB* também apresentou aumento na presença de MMS, porém sua indução ocorreu primariamente ao gene *chkA* (60 minutos na presença de MMS); cerca de 14 vezes após 60 minutos de crescimento na presença de BLEO; e ainda cerca de 6 vezes após 120 minutos de crescimento na presença de 4NQO (Figura 11B).

Esses resultados sugerem que embora não exista um fenótipo de sensibilidade no crescimento radial da colônia na presença de MMS, BLEO e 4-NQO estas proteínas podem estar envolvidas no reparo do dano causado por esses agentes genotóxicos e ainda que o gene *chkB* é primariamente induzido em resposta ao dano causado por MMS e BELO.

Figura 11: Os níveis das expressões dos genes *chkA* e *chkB* em resposta a presença de drogas. **(A)** Expressão do gene *chkA* na presença do dano ao DNA. **(B)** Expressão do gene *chkB* na presença do dano ao DNA. Os valores representam o número de vezes de aumento na expressão do RNAm na linhagem selvagem tratada em comparação com a linhagem selvagem crescida na ausência de droga, representado com o valor absoluto 1.

4.1.4. A participação dos genes $\Delta chkA^{CHK1}$ e $\Delta chkB^{CHK2}$ na resposta ao dano ao DNA causado por luz UV

Como parte da caracterização molecular dos genes *chkA*^{CHK1} e *chkB*^{CHK2}, conídios das linhagens mutantes $\Delta chkA$ e $\Delta chkB$ foram submetidos ao tratamento

com luz ultravioleta. A luz UV é um agente que interfere na função da forquilha de replicação (NYBERG et al., 2002; OSBORN et al., 2002). Os conídios quiescentes e germinantes (incubados por 4,5 horas antes da irradiação) foram expostos à luz UV e o percentual de sensibilidade foi estimado a partir da comparação com placas controle que não foram submetidas à luz UV.

A Figura 12A mostra que para conídios quiescentes, as linhagens mutantes $\Delta chkA$ e $\Delta chkB$ apresentaram maior sensibilidade em relação à linhagem selvagem a partir de 150 J/m², no entanto para conídios germinantes o mutante $\Delta chkA$ continua mostrando sensibilidade a partir de 100 J/m² enquanto $\Delta chkB$ apresentou sensibilidade igual ao da linhagem selvagem (Figura 12B).

Figura 12: A sensibilidade à luz UV das linhagens mutantes $\Delta chkA$ e $\Delta chkB$. **(A)** conídios quiescentes. **(B)** Conídios Germinantes. A viabilidade foi determinada como o percentual das colônias crescidas em placas irradiadas em relação ao controle não tratado. Os resultados mostram média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. A viabilidade das linhagens $\Delta chkA$ e $\Delta chkB$ foram significativamente diferente da linhagem selvagem em conídios quiescentes ($p < 0,05$), porém em conídios germinantes, $\Delta chkB$ é igual a linhagem selvagem ($p > 0,05$). Os resultados representam à média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram verificadas pelo teste ANOVA fator único seguido, quando significantes, do teste Student Newman-Keuls de comparação multipla. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.1.5. A Participação dos genes $\Delta chkA^{CHK1}$ e $\Delta chkB^{CHK2}$ na resposta ao estresse oxidativo

Em mamíferos, a sinalização do dano no DNA é rapidamente feita pela ATM e ATR, que são responsáveis diretos pela fosforilação de diversos alvos, entre eles, outras proteínas transdutores de sinal como CHK1 e CHK2 (NYBERG et al., 2002; MCKINNON, 2004). A fosforilação dessas proteínas por ATM/ATR ativa o ponto de checagem do ciclo celular na presença do dano ao DNA, e possivelmente durante o estresse oxidativo (BARZILAI et al., 2002). Em *A. nidulans* a AtmA está monitorando e/ou reparando o estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio (Malavazi et al, 2007). Recentemente, Malavazi et al. (2006) demonstraram que UvsB^{ATR} esta possivelmente monitorando o dano ao DNA induzidos por agentes que causam estresse oxidativo.

A partir desses dados, foi analisada a expressão dos genes $chkA^{CHK1}$ e $chkB^{CHK2}$ durante a resposta ao estresse oxidativo causado por Menadiona, Paraquat, Sulfato de Ferro (Fe_2SO_4), Cloreto de Cádmio ($CdCl_2$) e Sulfato de Zinco ($ZnSO_4$).

A Figura 13A mostra um relevante aumento da expressão do gene $chkA^{CHK1}$ quando na presença de Menadiona e Paraquat. Por outro lado, na presença dos outros agentes causadores de estresse oxidativo, o gene $chkA^{CHK1}$ também esta mais expresso, porém de forma menos acentuada. Diferentemente do gene $chkA^{CHK1}$, o gene $chkB^{CHK2}$ não tem sua expressão elevada na presença de H_2O_2 20' (0,25 mol/L) sendo que na presença de $CdCl_2$ e em Menadiona o gene $chkB^{CHK2}$ é altamente expresso (Figura 13B). Para os outros agentes causadores de estresse oxidativo, os genes $chkA^{CHK1}$ e $chkB^{CHK2}$ se apresentaram de forma igual. Estes resultados trazem evidências de que as proteínas ChkA e ChkB também estão envolvidas na resposta ao estresse oxidativo no fungo filamentoso *A. nidulans*.

Figura 13: Os valores da expressão dos genes *chkA*^{CHK1} e *chkB*^{CHK2} em resposta ao estresse oxidativo. **(A)** Expressão do gene *chkA*^{CHK1}. **(B)** Expressão do gene *chkB*^{CHK2}. Em todos os tratamentos, a linhagem selvagem GR5 foi induzida por 60', exceto para H₂O₂ que também foi induzida por 20'. As concentrações utilizadas foram: H₂O₂ 20' e 60' (5, 25 e 100mM), Menadiona (0,1 e 0,5mM), Paraquat (5 e 10mM), Fe₂SO₄ (0,25 e 0,5mM), CdCl₂ (0,1 e 0,2mM), e ZnSO₄ (0,1 e 0,25mM). "Real-Time" RTPCR foi o método utilizado para quantificar o mRNA. As amostras foram normalizadas usando os valores C_T obtidos pela amplificação do RNAm de tubC na mesma amostra. A relação quantitativa da expressão dos genes *chkA*^{CHK1}, *chkB*^{CHK2} e *tubC* foi determinada por uma curva padrão. Os valores representam o número de cópias de RNAm das amostras tratadas em relação a linhagem selvagem não tratada com droga (representada como 1.00).

4.1.6. A participação dos genes *chkA* e *chkB* durante a reprodução sexuada em *A. nidulans*

Em *S. cerevisiae*, várias proteínas (Mec1, Rad24 e Rad17) envolvidas no ponto de checagem do dano ao DNA na fase S também participam do ponto de checagem meiótico (LYDALL et al 1996). Em mamíferos as proteínas ATM, ATR, Rad1 e Chk1 as quais estão envolvidas no ponto de checagem do dano ao DNA na

fase S do ciclo celular, são encontradas na estrutura dos cromossomos meióticos, e acredita-se possuírem funções importantes durante a recombinação meiótica, durante a parada do ciclo celular, durante meiose e apoptose (ROEDER & BAILIS 2000).

Para verificar a expressão dos genes *chkA* e *chkB* durante o desenvolvimento sexual em *A. nidulans*, uma cultura teve seu crescimento sincronizado de modo a obter células no mesmo estágio do desenvolvimento e então foram transferidos do meio líquido para placa com meio de cultura sólido. O RNA foi isolado em tempos distintos depois do período de indução e o RNA pertencente a cada estágio foi submetido a “Real-Time RT-PCR” para determinar os valores de expressão dos genes *chkA* e *chkB*.

O gene *chkA* apresentou um aumento gradativo de sua expressão a partir de 72 horas após indução sexual ficando 2 vezes mais expresso após 120 horas (Figura 14A), enquanto que o gene *chkB* apresentou aumento de sua expressão a partir de 24 horas após iniciada a indução sexual, ficando 3 vezes mais elevada após 120 horas (Figura 14B).

Esses resultados sugerem que as proteínas podem estar envolvidas no desenvolvimento sexual e meiose em *A. nidulans*.

Figura 14: Os valores da expressão dos genes *chkA*^{CHK1} e *chkB*^{CHK2} durante o desenvolvimento sexual de *A. nidulans*. **(A)** Representa os valores da expressão do gene *chkA* e em **(B)** estão representados os valores da expressão do gene *chkB*. “Real-Time” RTPCR foi o método utilizado para quantificar o RNAm. As amostras foram normalizadas usando os valores C_T obtidos pela amplificação do RNAm de *tubC* na mesma amostra. A relação quantitativa da expressão dos genes *chkA*, *chkB* e *tubC* foram determinadas por uma curva padrão. Os valores representam o número de cópias de RNAm em relação a linhagem selvagem não tratada com droga (representada como 1.00).

4.1.7. A participação dos genes $\Delta chkA^{CHK1}$ e $\Delta chkB^{CHK2}$ no ponto de checagem da fase S

Uma importante função de sobrevivência da célula na presença do dano no DNA é a inibição do ciclo celular através da ativação de pontos de checagem. A hidroxiuréia é um inibidor da enzima ribonucleotídeo redutase, uma enzima limitante na via metabólica de produção de dNTPs. HU suprime a conversão de ribose trifosfato para desoxirribose trifosfato (BERGEN; MORRIS, 1983). A depleção de dNTPs ativa o ponto de checagem da fase G1/S do ciclo celular o que causa bloqueio na fase S (DESANY et al., 1998). Além disso, o início da replicação do DNA na presença de altas concentrações de HU causa quebra de dupla fita (MERRILL; HOLM, 1999). Como HU é um potente inibidor da síntese de DNA em *A. nidulans* (BERGEN; MORRIS, 1983) e a fim de se verificar o papel dos genes *chkA* e *chkB* no reparo de quebra de dupla fita, ou na ativação do ponto de checagem da fase S, verificamos aqui a capacidade das linhagens mutantes em crescer nas concentrações de 0,06 e 0,1 mol/L de HU.

De acordo com Allen et al. (1994) o tratamento agudo com HU causa letalidade severa em mutantes que são especialmente defectivos no ponto de checagem da fase S, porém não naqueles defectivos no reparo de quebra de dupla fita ou em outros pontos de checagem relacionados ao dano ao DNA. Dessa forma, é possível diferenciar, baseado na hipersensibilidade a HU, um mutante que está envolvido ou no reparo do DNA ou na ativação dos pontos de checagem do ciclo celular. Para isso, um ensaio de mitose foi utilizado para verificar se o ponto de checagem da fase S estava prejudicado nesse mutante (FAGUNDES et al., 2004). Este ensaio monitora a mitose nas linhagens testadas incubadas na presença de 0,06 e 0,1 mol/L de HU por 5 a 7 horas, verificando a funcionalidade do ponto de checagem de replicação do DNA. Durante os experimentos, germinantes crescidos na presença de 0,06 e 0,1 mol/L de HU, que apresentavam mais de um núcleo à microscopia óptica foram considerados como germinantes que romperam o bloqueio na fase S.

A Tabela 7 mostra que as linhagens mutantes $\Delta chkA^{CHK1}$ e $\Delta chkB^{CHK2}$ não apresentaram defeito no ensaio de mitose indicando que os germinantes foram capazes de bloquear o ciclo celular.

Tabela 7: Ensaio de mitose das linhagens mutantes $\Delta chkA$, $\Delta chkB$ e selvagem.

Linhagens	HU (mol/L)*		
	0	0,06	0,1
Tipo Selvagem	62,6±2,9	10,4±2,2	1,0±0,5
$\Delta chkA$	58,3±7,4	6,3±1,5	0,0±0,0
$\Delta chkB$	60,5±5,9	10,0±3,9	0,0±0,0

*O percentual dos germinantes que apresentavam dois ou mais núcleos após incubação com HU foi determinado como germinantes que não apresentavam bloqueio de mitose. Os resultados representam à média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes com 100 germinantes tendo sido analisados em cada um. Diferenças estatísticas foram verificadas pelo teste ANOVA fator único seguido, quando significantes, do teste Student Newman-Keuls de comparação múltipla. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.1.8. A Participação dos genes $chkA^{CHK1}$ e $chkB^{CHK2}$ no crescimento polarizado em conídios de *A. nidulans*

Durante o crescimento dos conídios de fungos filamentosos, alguns fenômenos ocorrem ordenadamente visando promover o crescimento das hifas. A primeira mitose ocorre cerca de 4 horas após a saída do estado de quiescência do esporo (G1). Durante a quebra da dormência, o esporo intumescce e aumenta seu volume citoplasmático. Nesse período todas as células devem crescer isotropicamente, pela deposição de novas camadas de parede celular em todas as direções. Surge dessa forma o tubo germinativo, gerando um eixo de crescimento polarizado. A formação do tubo germinativo e do crescimento polarizado indica que a célula encontrou condições ideais para o crescimento. Após essa etapa inicial, a célula continua seu crescimento e aproximadamente depois da terceira divisão celular, ocorre à formação do primeiro septo nos germinantes de *A. nidulans* (o que é equivalente à citocinese de células de mamíferos).

O crescimento polarizado é uma das características mais peculiares do crescimento das células fúngicas, tanto em células de leveduras como de fungos filamentosos (HARRIS, 1999). A forma mais conveniente de se verificar o crescimento polarizado do esporo é a presença do tubo germinativo. Embora alguns experimentos relatem que a polarização das moléculas de actina do citoesqueleto ocorra primariamente à emissão do tubo germinativo, este evento não pode ser detectado convenientemente nas condições de cultura utilizadas no experimento. Dessa forma, um esporo é classificado como polarizado microscopicamente pela presença do tubo germinativo. Uma vez que os esporos de *A. nidulans* apresentam

uma morfologia esférica, o tubo germinativo pode ser facilmente detectado pela presença de pequenas protuberâncias na superfície do conídio corado com DAPI e calcoflúor (HARRIS, 1999).

Diante da importância desse ponto de checagem, o crescimento polarizado foi estudado nas linhagens JFL3 e JFL4 para verificar se as proteínas ChkA e ChkB interferem no estabelecimento do tubo germinativo após bloqueio na fase S com a droga HU.

Após a liberação do bloqueio de 5 horas com 50 mM de HU, amostras das linhagens mutantes $\Delta chkA^{CHK1}$ e $\Delta chkB^{CHK2}$ e da linhagem selvagem GR5, foram retiradas nos tempos 0, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos e as células que apresentavam tubo germinativo e, portanto, crescimento polarizado, foram contadas em cada tempo.

Na Figura 15 foi observado que o mutante $\Delta chkA^{CHK1}$ apresentou maior percentual de células com tubo germinativo nos tempos 120' e 150' em relação à linhagem selvagem, no entanto, o mutante $chkB^{CHK2}$ apresentou um percentual menor nos tempos de 30' e 90' em relação a linhagem selvagem sugerindo que as proteínas ChkA e ChkB podem estar envolvidas no estabelecimento e na manutenção do crescimento polarizado em *A. nidulans*.

Figura 15: A análise do crescimento polarizado em conídios da linhagem selvagem e nos mutantes $\Delta chkA^{CHK1}$ e $\Delta chkB^{CHK2}$. O gráfico representa o percentual de germinantes que apresentaram emissão de tubo germinativo nos tempos indicados após liberação do bloqueio na fase S com 50 mM de HU por 5 horas a 37°C. Os pontos indicam os valores referentes à média $\pm$ desvio padrão de 100 germinantes analisados em 3 experimentos independentes, corados com DAPI e calcoflúor. Diferenças estatísticas foram verificadas pelo teste ANOVA fator único seguido, quando significantes, do teste Student Newman-Keuls de comparação múltipla. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.1.9. As possíveis interações genéticas envolvendo os genes *chkA*^{CHK1}, *chkB*^{CHK2}, *atmA*^{ATM} e *uvsB*^{ATR}.

A fim de compreender possíveis interações entre os genes *chkA*^{CHK1}, *chkB*^{CHK2}, *atmA*^{ATM} e *uvsB*^{ATR} na resposta ao dano ao DNA em *A. nidulans*, foram construídas as linhagens duplos mutantes $\Delta chkA::pyrG \Delta chkB::pyro$ (JFL100), $\Delta chkA::pyrG \Delta atmA::pyrG$ (JFL3-69), $\Delta chkA::pyrG \Delta uvsB::argB$ (JFL3-14), $\Delta chkB::pyro \Delta atmA::pyrG$ (JFL4-69), e $\Delta chkB::pyro \Delta uvsB::argB$ (JFL4-14).

Num primeiro grupo de experimentos, as interações entre esses genes foram verificadas pela comparação de sensibilidade a agentes mutagênicos. Quando um duplo mutante apresentava maior sensibilidade a uma droga mutagênica em comparação as duas linhagens parentais, a relação entre as duas foi determinada como sinérgica, sugerindo que os dois genes estão atuando em vias paralelas de reparo. Por outro lado, quando um duplo mutante apresentou sensibilidade comparável àquela de seus dois parentais isoladamente, as relações foram ditas epistáticas, sugerindo que os dois genes estavam atuando numa mesma via de reparo ao dano ao DNA e quando o duplo mutante apresentou seu crescimento intermediário àquela de seus dois parentais isoladamente, a relação entre as duas foi determinada como supressão.

Os resultados mostraram que os genes *chkA* e *uvsB* são epistáticos na presença de HU (Figura 16A) e os genes *chkA* e *atmA* atuam em sinérgico na presença de HU e MMS (Figura 16B). Interessantemente, os genes *chkB* e *uvsB* atuam em sinérgico na presença de CPT (Figura 16C) e o gene *chkB* suprime *atmA* na presença de 4-NQO (Figura 16D).

Figura 16: O fenótipo de sensibilidade das linhagens duplos mutantes a drogas que causam o dano ao DNA. **(A)** Os duplos mutantes $\Delta chkA::pyrG \Delta chkB::pyro$, $\Delta chkA::pyrG \Delta uvrB::argB$ e seus parentais na presença de HU. **(B)** O duplo mutante $\Delta chkA::pyrG \Delta atmA::pyrG$ e seus parentais na presença de HU e MMS. **(C)** O duplo mutantes $\Delta chkB::pyro \Delta uvrB::argB$ e seus parentais na presença de CPT. **(D)** O duplo mutante $\Delta chkB::pyro \Delta atmA::pyrG$ na presença de 4-NQO. As linhagens foram crescidas por 48 horas na presença e na ausência de HU, CPT, 4NQO, e MMS. As linhagens foram crescidas na presença das drogas indicadas e incubadas por 72 horas a 37°C.

Como uma segunda abordagem para a identificação de interações genéticas entre os genes *atmA*, *chkA*, *chkB* e *UvsB*, verificamos o comportamento das linhagens duplos mutantes na presença de luz UV.

A sensibilidade à luz UV foi testada em conídios que estavam quiescentes e também aqueles que foram germinados por 4,5 horas a 30°C (ditas germinantes) antes da exposição à luz UV. As linhagens mutantes e duplos mutantes estudadas e uma linhagem selvagem foram expostas.

Como ocorreu nos experimentos de crescimento radial na presença de agentes mutagenicos, verificamos que os genes *chkA* e *atmA* atuam de forma sinérgica quando conídios germinantes foram expostos à luz UV (Figura 17D direita) indicando novamente que os genes *chkA* e *atmA* estão atuando em vias paralelas no reparo ao dano ao DNA ($p < 0,05$). Entretanto, diferentemente dos experimentos com drogas o gene *chkA* não está epistático em relação à *UvsB* (Figura 17B). Em conídios quiescentes, em doses de 150 e 200 J/m², o gene *chkA* atua em sinérgismo com o gene *UvsB* ($p < 0,05$) (Figura 17B esquerda). Quando germinantes, conídios dos duplos mutantes $\Delta chkA \Delta chkB$ e $\Delta chkB \Delta atmA$ apresentaram sinérgismo, em relação aos seus parentais, em todas as doses de exposição a luz UV (Figura 17A e 17E direita) ($p < 0,05$), o que não ocorre na presença de drogas onde a mutação $\Delta chkB$ suprime o defeito do mutante $\Delta atmA$ na presença de 4-NQO. Os genes *chkA* e *chkB* estão interagindo sinérgicamente em altas doses de exposição a luz UV quando conídios quiescentes são expostos (Figura 17A esquerda).

Figura 17: A viabilidade das linhagens mutantes e duplos mutantes após exposição à luz UV em conídios quiescentes e germinantes. **(A)** linhagens $\Delta chkA$, $\Delta chkB$ e $\Delta chkA \Delta chkB$. **(B)** linhagens $\Delta chkA$, $\Delta uvsB$ e $\Delta chkA \Delta uvsB$. **(C)** $\Delta chkB$, $\Delta uvsB$ e $\Delta chkB \Delta uvsB$. **(D)** linhagens $\Delta chkA$, $\Delta atmA$ e $\Delta chkA \Delta atmA$. **(E)** linhagens $\Delta chkB$, $\Delta atmA$ e $\Delta chkB \Delta atmA$. A viabilidade foi determinada como o percentual das colônias crescidas em placas irradiadas em relação ao controle não tratado. Conídios germinantes foram aqueles incubados por 4,5 horas a 30°C previamente a irradiação. Os resultados expressos são a média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram verificadas pelo teste ANOVA fator único seguido, quando significantes, de teste Student Newman-Kels de comparação múltipla. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Num terceiro grupo de experimentos para classificar as interações genéticas entre os genes *atmA*, *chkA*, *chkB* e *uvsB*, foi verificado o estado de funcionalidade do ponto de checagem da replicação do DNA através do ensaio de mitose. Como mostrado anteriormente, os mutanes $\Delta chkA$ e $\Delta chkB$ não apresentaram defeito no ensaio de mitose indicando que os germinantes foram capazes de bloquear o ciclo celular na fase S, no entanto, assim como ocorreu em resposta ao dano ao DNA causado por luz UV, o duplo mutante $\Delta chkA \Delta chkB$ apresentou defeito na capacidade de bloquear o ciclo celular sugerindo que essas duas vias atuam em sinergismo para o bloqueio da fase S (Tabela 8).

Tabela 8: Ensaio de mitose das linhagens mutantes $\Delta chkA$, $\Delta chkB$, selvagem e duplos mutantes.

Linhagens	HU (mol/L)*		
	0	0,06	0,1
Tipo Selvagem	62,6±2,9	10,4±2,2 ^c	1,0±0,5 ^d
$\Delta chkA$	58,3±7,4	6,3±1,5 ^{b c}	0,0±0,0 ^d
$\Delta chkB$	60,5±5,9	10,0±3,9 ^{b c}	0,0±0,0 ^d
$\Delta uvsB$	62,7±5,9	15,3±2,5 ^c	12,7±3,2 ^a
$\Delta atmA$	67,7±2,5	31,33±4,04 ^a	3,67±0,58 ^{a d}
$\Delta chkA \Delta chkB$	60,0±5,0	19,0±1,0 ^{a c}	1,0±0,0 ^d
$\Delta chkA \Delta uvsB$	56,0±1,7	7,7±2,1 ^c	0,0±0,0 ^d
$\Delta chkA \Delta atmA$	58,3±2,9	9,0±1,0 ^c	0,0±0,0 ^d
$\Delta chkB \Delta uvsB$	51,7±2,9	8,3±1,5 ^c	0,0±0,0 ^d
$\Delta chkB \Delta atmA$	64,3±8,1	10,0±0,0 ^c	0,0±0,0 ^d

*O percentual dos germinantes que apresentavam dois ou mais núcleos após incubação com HU foi determinado. Os resultados representam a média±desvio padrão de três experimentos independentes com 100 germinantes tendo sido analisados em cada um. Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas pelo teste ANOVA seguido do teste de Student Newman-Keuls de comparação múltipla (Sigma Stat Statistical Software, Jandel Scientifics). $p < 0,05$ foi considerado significativo.

^a estatisticamente diferente da linhagem selvagem

^b estatisticamente diferente de $\Delta chkA \Delta chkB$

^c estatisticamente diferente de $\Delta atmA$

^d estatisticamente diferente de $\Delta uvsB$

Na presença de evidências que indicam que os genes *chkA* e *chkB* estão interagindo de forma epistática e sinérgica com outras proteínas no reparo ao dano ao DNA verificamos se o crescimento polarizado foi afetado nessas linhagens duplo mutantes. Interessantemente, os resultados mostraram que os genes *atmA*,

chkA, *chkB* e *uvsB* atuam de forma complementar no estabelecimento do tubo germinativo em *A. nidulans*. Como observado na figura 18, os duplos mutantes tem uma redução no percentual do crescimento polar em relação aos seus parentais mostrando sinergismo entre eles. No entanto, o duplo mutante $\Delta chkB \Delta atmA$ tem seu crescimento quase nulo ($p < 0,001$) (Figura 18 E), enquanto o duplo mutante $\Delta chkA \Delta uvsB$ tem seu crescimento igual ao seu parental mutante $\Delta uvsB$ ($p = 0,121$) (Figura 18 B).

Figura 18: O crescimento polarizado das linhagens mutantes e duplos mutantes. **(A)** linhagens $\Delta chkA$, $\Delta chkB$ e $\Delta chkA \Delta chkB$, o duplo é estatisticamente diferente a partir do tempo 60' em relação as linhagens parentais. **(B)** linhagens $\Delta chkA$, $\Delta uvsB$ e $\Delta chkA \Delta uvsB$, a linhagem $\Delta uvsB$ tem seu crescimento igual ao duplo mutante. **(C)** $\Delta chkB$, $\Delta uvsB$ e $\Delta chkB \Delta uvsB$, o duplo é estatisticamente diferente a partir do tempo 120' em relação as linhagens parentais. **(D)** linhagens $\Delta chkA$, $\Delta atmA$ e $\Delta chkA \Delta atmA$, o duplo é estatisticamente diferente a partir do tempo 120' em relação as linhagens parentais. **(E)** linhagens $\Delta chkB$, $\Delta atmA$ e $\Delta chkB \Delta atmA$, o duplo é estatisticamente diferente a partir do tempo 90' em relação as linhagens parentais. Os resultados expressos são a média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram verificadas pelo teste ANOVA fator único seguido, quando significantes, de teste Student Newman-Kels de comparação múltipla. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.1.10. Discussão

As proteínas quinases ATM e ATR têm papéis centrais na resposta ao dano ao DNA e regulam diretamente pelo menos duas outras proteínas quinases, CHK1 e CHK2, as quais são responsáveis pela transmissão dos sinais dos pontos de checagem do ciclo celular (BARTEK & LUKAS 2003; YINHUI & SANCHEZ 2004; AHN et al. 2004). Essas quinases são do tipo serina/treonina e são ativadas em resposta ao dano ao DNA regulando funções celulares fundamentais, tais como; a replicação do DNA, a progressão do ciclo celular, a reestruturação da cromatina e a apoptose (BARTEK & LUKAS 2003). Aqui nós caracterizamos os homólogos ChkA^{CHK1} e ChkB^{CHK2} de *A. nidulans*. A proteína homóloga Chk1 foi a primeira a ser caracterizada em fungos filamentosos. Embora em *S. cerevisiae* e *S. pombe* a proteína holo de Chk1 não seja essencial para a viabilidade, em ratos, ela é essencial para o desenvolvimento embrionário (CHEN & SANCHEZ 2004). Em *S. cerevisiae* a proteína homóloga de Chk2, rad53p, é essencial para o desenvolvimento, no entanto, em *S. pombe* quando o gene foi inativado seu crescimento ocorreu normalmente (SHIMADA et al. 2002; PEREZ-HIDALGO et al. 2003).

Da mesma forma que ocorreu em *S. pombe*, no fungo filamentoso *A. nidulans* as inativações dos genes *chkA* e *chkB* são viáveis. No entanto, em ratos, diferentemente do gene *chk1* a inativação do gene *chk2* é viável, e não mostrou nenhum fenótipo tumoral, exceto quando expostos a agentes carcinogênicos (BARTEK e LUKAS 2003); neste mesmo organismo foi relatado que Chk2 está ativa durante a resposta ao dano ao DNA causado por IR e induz a apoptose (AHN et al. 2004). Em levedura não foi demonstrada nenhuma função de Chk1 nos pontos de checagem da fase S, no entanto, a proteína homóloga Chk2 de leveduras, Cds1, é ativada após o dano ser induzido por HU na fase S (BODDY et al. 1998; LINDSAY et al. 1998). Quando Cds1 está ausente em *S. pombe*, a proteína homóloga de Chk1 torna-se ativa na presença de dano no DNA causado por HU na fase S do ciclo celular, e a perda de ambas as proteínas, Chk1 e Cds1, conduz a um aumento de sensibilidade na presença de agentes mutagênicos (LINDSAY et al. 1998; BRONDELLO et al. 1999). Em contraste, CHK1 não tem sua função limitada aos pontos de checagem da fase S, ele é também ativado por DSBs quando esses são causados por IR em células de mamíferos (CHEN; SANCHEZ 2004).

Em mamíferos, a proteína CHK2 tem sua função sobreposta em todos os pontos de checagem do ciclo celular e é ativado na resposta ao dano ao DNA causado por luz UV ou IR e também no bloqueio replicacional (BARTEK; LUKAS 2003; AHN et al. 2004). Existem muitos substratos comuns entre CHK1 e CHK2, sendo que CHK2 parece funcionar em conjunto com CHK1 durante a resposta ao estresse genotóxico, além de sua função na resposta ao dano ao DNA causado por IR de induzir a apoptose (CHEN; SANCHEZ 2004). Em leveduras Chk1 responde ao dano ao DNA que acomete o atraso da fase S ou G2, mas é inerte para danos que ocorrem na fase S ou no bloqueio replicacional; em contraste, a proteína Chk1 de mamíferos tem funções muito mais amplas durante as repostas a todas as formas de estresse genotóxico (CHEN e SANCHEZ 2004).

Nós observamos que o crescimento do mutante $\Delta chkA^{CHK1}$ só foi sensível na presença de HU e luz UV quando seus conídios germinantes foram expostos. O crescimento do mutante $\Delta chkA^{CHK2}$ não foi afetado por agentes causadores de dano ao DNA, e seus conídios quiescentes são sensíveis a luz UV. Entretanto, ambos os genes mostraram um aumento da expressão do RNAm na presença de agentes causadores de dano ao DNA. Supreendentemente, ambos os mutantes em *A. nidulans* tem seus pontos de checagem replicacional da fase S intactos. Foi também observado que o duplo mutante $\Delta chkA \Delta chkB$ em *A. nidulans* apresentou maior sensibilidade para HU e seus conídios quiescentes e germinantes tiveram maior sensibilidade à luz UV em relação aos seu parentais mutantes, sugerindo que ambos os mutantes estão interagindo. Reforçando esses resultados, os mutantes $\Delta chkA$ e $\Delta chkB$ tem seu ponto de checagem da fase S intactos na presença de 6 mM de HU, o que não ocorre com o duplo mutante $\Delta chkA \Delta chkB$.

As espécies reativas ao oxigênio (ROS) como o peróxido de hidrogênio e o hidroperóxido terc-butila foram demonstrados como indutores da resposta do ponto de checagem G2/M em células eucarióticas, e a progressão da fase G2 do ciclo celular para mitose é altamente dependente da atividade do complexo ciclina B/Cdc2. A atividade bem como a entrada da célula em mitose é suprimida de maneira dependente de SOD (superoxido dismutase) pelo hidroperóxido terc-butila em fibroblastos humanos, o que atrasa a ativação do complexo ciclina B/Cdc2 resultando na defosforilação da proteína Cdc2 pela fosfatase Cdc25C (SHACKELFORD et al. 2000; SHACKELFORD et al. 2001; CICCHILLITTI et al.

2003). Em células deficientes de ATM existe um atraso no ponto de checagem mitótico quando o estresse oxidativo é induzido por terc-butila o que não acontece em células normais, indicando que possivelmente ATM e as proteínas que estão “downstream” a ATM no ponto de checagem G2/M durante o estresse oxidativo têm um papel na ativação de Cdc25C.

Outros estudos mostraram que ATM fosforila pelo menos de 3 proteínas envolvidas nos pontos de checagem celular durante hiperoxia confirmando o envolvimento de ATM na resposta ao estresse oxidativo. Em contraste, ATR só fosforila a proteína Chk1 durante hiperoxia (HELT et al., 2004).

Em *A. nidulans* a proteína AtmA esta monitorando e/ou reparando o estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio (Malavazi et al, 2007). Recentemente, Malavazi et al. (2006) demonstraram que UvsB^{ATR} esta possivelmente monitorando o dano ao DNA induzidos por agentes que causam estresse oxidativo. Neste trabalho foi observado que ChkA e ChkB são expressos na presença de agentes causadores de estresse oxidativo mostrando uma possível função no monitoramento e ou reparo ao estresse oxidativo.

Estudos em *C. elegans*, *D. melanogaster* e *N. crassa* têm revelado novas funções para Chk2 que não foram mostradas nas células de humanos ou ratos (AHN et al. 2004; PREGUEIRO et al. 2006). Em *D. melanogaster*, a proteína homóloga Chk2 é altamente expressa em ovários durante a embriogênese e a perda da função de Chk2 leva a instabilidade genômica (OISHI et al. 2001). Em *C. elegans* a inativação do gene *chk2* através de RNAi mostrou que esta proteína quinase é essencial para recombinação meiótica (HIGASHITANI et al. 2000). Interessantemente, em *S. pombe* e *D. melanogaster* as proteínas homólogas de Chk2 também regulam o ponto de checagem mitótico (SHIMADA et al. 2002; PEREZ-HIDALGO et al. 2003). Neste trabalho não foi observado nenhum defeito no ciclo sexual de *A. nidulans* nas linhagens mutantes $\Delta chkA$ e $\Delta chkB$. Entretanto, a expressão destes genes está aumentada durante o desenvolvimento sexual.

Nossos resultados sugerem que as proteínas ChkA e ChkB de *A. nidulans* conservaram suas funções biológicas específicas durante a resposta ao dano ao DNA. Além disso, eles indicam um alto nível de redundância, ou seja, quando ambos os genes estão inativados, ocorre aumento da sensibilidade durante a resposta ao dano ao DNA. Atualmente o modelo proposto por BARTEK e LUKAS (2003) no qual a “missão biológica das proteínas CHK1 e CHK2 é uma mútua complementação,

cooperação íntima de funções entre CHK1 e CHK2 onde CHK2, contribui decisivamente sob circunstâncias de DSBs” e isso se aplica também as proteínas homólogas ChkA e ChkB de *A. nidulans*. Entretanto, não foi observada uma participação de ChkB em DSB, exceto o acúmulo de RNAm quando expostos a BLEO e CPT. Adicionalmente, o fato de que o ponto de checagem da fase S se mostra intacto na presença 100 mM de HU, sugere que possivelmente existe uma terceira quinase ou uma via diferente envolvida no ponto de checagem da fase S em *A. nidulans*. Existe ainda uma variedade de assuntos a serem verificados antes de uma visão completa das funções de ChkA e ChkB na resposta ao dano ao DNA.

Tem sido proposto que CHK1 é primariamente regulado por ATR na resposta ao bloqueio replicacional em resposta ao dano ao DNA causado por luz UV, enquanto que CHK2 é regulado por ATM em resposta a DSBs causados por IR. Essa visão necessita ser modificada, se for considerado os estudos recentes aonde CHK1 é ativado pela via da ATM (GATEI et al. 2003) e a fosforilação de CHK2 em resposta ao dano no DNA causado por luz UV e HU não necessita de ATM (MATSUOKA et al. 2000; WANG et al. 2006).

Em resposta ao dano ao DNA ou estresse replicacional, CHK1 é fosforilado e ativado por ATR e/ou ATM em leveduras, *Xenopus laevis* e mamíferos (CHEN; SANCHEZ 2004). Para investigar as interações genéticas entre *chkA*, *chkB*, *atmA* e *uvsB*, foram construídas as linhagens duplo mutantes $\Delta chkA \Delta atmA$, $\Delta chkA \Delta uvsB$, $\Delta chkB \Delta atmA$ e $\Delta chkB \Delta uvsB$. O duplo mutante $\Delta chkA \Delta atmA$ mostrou-se mais sensível a MMS, HU e à luz UV quando seus conídios foram germinados comparados com seus parentais mutantes. Foram também observadas interações entre $\Delta chkB \Delta atmA$ e $\Delta chkB \Delta uvsB$ já que os duplos mutantes apresentaram menor sensibilidade a 4-NQO.

Conídios quiescentes do duplo mutante $\Delta chkB \Delta uvsB$ mostraram a mesma sensibilidade a luz UV comparado aos seus parentais mutantes. Surpreendentemente foi verificado que a presença da mutação $\Delta chkA$ ou $\Delta chkB$ são suficientes para suprimir o ponto de checagem da fase S nos mutantes $\Delta atmA$ e $\Delta uvsB$. A supressão de um alelo nulo é esperada para mutantes que estão “downstream” e ativam vias independentes do produto gênico suprimido (PRELICH 1999). Assim é possível que *chkA* e *chkB* estejam posicionados abaixo de *atmA* e *uvsB* na via do ponto de checagem do ciclo celular como descrito para outros

organismos. Esses resultados revelaram uma forte interação entre as proteínas apicais AtmA e UvsB e o sinal transmitido por ChkA e ChkB. Essas proteínas parecem ter funções redundantemente complementares durante a resposta ao dano ao DNA de *A. nidulans*.

4.2. Módulo 2: Isolamento e caracterização fenotípica do mutante *ddbA*^{*ddb1*} em *A. nidulans*.

4.2.1. A identificação do gene *ddbA* de *A. nidulans*

Uma busca no banco de dados de *A. nidulans* no Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>) utilizando uma sequência *DDB1* de *Homo sapiens*, revelou uma única sequência com similaridade relevante. O possível homólogo AN0596.3, é uma proteína que contém 1.132 aminoácidos com 46% de similaridade e 26% de identidade (e-value $1e-104$) relativos à sua proteína homóloga em humanos. A proteína homóloga de *DDB1* em *A. nidulans* foi denominada como *DdbA* e não possui nenhuma similaridade com a proteína *DDB2*, que não foi encontrada no banco de dados analisado de *A. nidulans*. A partir da sequência da proteína *DdbA*, uma análise filogenética foi feita para determinar uma relação evolutiva entre *DdbA* e *DDB1* em diferentes organismos. Interessantemente, os *Ddbs* de fungos formam um clado distinto (Figura 19).

Figura 19: A análise filogenética da proteína *DdbA*. A análise filogenética foi gerada usando MEGA-2 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 3.1) software (18, 2001; <http://www.megasoftware.net>). A sequência foi alinhada no dendrograma e determinado pelo uso do ClustalX e o método Neighbor-Joining, respectivamente (Saitou and Nei, 1987; Thompson et al., 1997). Uma análise “bootstrap” (Felsenstein 1985) foi feita (1,025 repetições) para avaliar a topologia da árvore filogenética. As seguintes proteínas foram usadas nesta análise: XP_658200.1 *A. nidulans*; XP_750984.1 *A. fumigatus*; XP_001214243.1 *A. terreus*; BAE59059.1 *A. oryzae*; EAT83885.1 *P. nodorum*; EAS34682.1 *C. immitis*; XP_962347.1 *N. crassa*; XP_385428.1 *G. zeae*; XP_001223417.1 *C. globosum*; NP_001056495.1 *O. sativa*; BAB20761.1 *O. sativa*; NP_192451.1 *A. thaliana*; Q6QNU4 *L. esculentum*; NP_193842.1 *A. thaliana*; Q6E7D1 *L. esculentum*; XP_975549.1 *T. castaneum*; NP_001914.2 *H. sapiens*; EAT46411.1 *A. aegyptii*; P33194 *C. Aethiops*; CAC94909.1 *M. musculus*; NP_502299.1 *C. elegans*; e XP_637896.1 *D. discoideum*.

4.2.2. A inativação do gene *ddbA*^{*DDB1*} em *A. nidulans*

Com o objetivo de avaliar a função do gene *ddbA* em *A. nidulans*, foi construída uma linhagem mutante para este gene. A região escolhida para a deleção ficou compreendida na fase aberta de leitura (“open reading frame” - ORF) do gene *ddbA* que contém 3628 pb. A linhagem resultante da deleção foi denominada como JFL2.

Para construção da linhagem JFL2, foram feitas quatro reações de PCR distintas. No primeiro passo, o cassete *zeo-pyrG* de 2.417 pb foi amplificado a partir do plasmídeo pCDA21; em seguida duas reações de PCR foram realizadas, uma amplificando 2 kb da região 5'UTR e outra amplificando 2 kb da região 3' UTR da ORF do gene *ddbA* (ANO596.3), utilizando-se o DNA genômico de uma linhagem selvagem (FGSC A4). No quarto e último passo foi realizada uma reação de PCR substituindo o DNA genômico pelos três fragmentos obtidos nas reações anteriores e ainda os “primers” das extremidades 5' e 3' do cassete, originando assim, um novo fragmento de 6417 pb, utilizado para transformar uma linhagem TNO2A3 (Figura 20A). Os transformantes foram selecionados em meio YAG (prototrofia para uridina e uracila).

O DNA genômico de alguns candidatos transformados e o da linhagem TNO2A3 foi extraído e digerido com a enzima de restrição *XhoI* (Figura 20B) para posterior análise por “Southern blot” e assim verificar se houve integração homóloga do cassete no *locus* do gene *ddbA*. A enzima *XhoI*, digeriu o gene *ddbA* liberando dois fragmentos de 675 pb e 2.879 pb, sendo que, na linhagem transformada, a enzima *XhoI* digeriu o cassete liberando dois fragmentos, um de 1.259 pb e outro de 1.743 pb. Um fragmento de 2 kb correspondendo à região 3' UTR do DNA foi marcado radioativamente com [α -³²P] dCTP e utilizado como sonda. A sonda também reconheceu um fragmento de 1 kb da região 3' UTR digerido pela enzima *XhoI* (Figura 20C).

A **B** **C**

Figura 20: A inativação e a confirmação da linhagem mutante $\Delta ddbA$. **(A)** Esquema ilustrado da estratégia de deleção do gene *ddbA* usando a técnica “PCR- mediated”; **(B)** DNA genômico da linhagem selvagem e $\Delta ddbA$ digeridos com a enzima de restrição *XhoI* e os fragmentos utilizados para hibridação **(C)** bandas reconhecidas após a hibridação (uma banda de 2.879 pb na linhagem selvagem e outra de 1.743 pb no $\Delta ddbA$ além de aparecer uma banda de 1 kb em ambas as linhagens).

4.2.3. A Participação do gene *ddbA*^{DDB1} na resposta celular ao dano ao DNA

Para analisar as possíveis funções do gene *ddbA* na resposta ao dano ao DNA, utilizamos de dois caminhos: (i) O crescimento da linhagem mutante $\Delta ddbA$ na presença de agentes causadores de dano ao DNA (CPT, 4NQO, HU e BLEO) e (ii) como a expressão do gene foi afetada na presença destes e outros agentes.

No primeiro teste, a linhagem mutante $\Delta ddbA$ apresentou maior sensibilidade, em relação a linhagem selvagem, somente para 4-NQO (Figura 21A). Na presença das outras drogas, $\Delta ddbA$ teve a sua esporulação mantida e o seu crescimento ocorreu normalmente e independente do meio de cultura utilizado o fenótipo de $\Delta ddbA$ foi mantido.

Após este resultado, esporos quiescentes e germinante da linhagem selvagem e do mutante $\Delta ddbA$ foram expostos a diferentes doses de luz UV (50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 J/m²) e a sua viabilidade foi determinada pelo percentual de conídios que formaram colônias após a exposição em relação aos conídios que não foram submetidos a luz UV.

A linhagem mutante $\Delta ddbA$ não apresentou sensibilidade quando conídios quiescentes foram expostos a luz UV, no entanto, conídios germinantes exibiram aumento da sensibilidade em todas as doses de exposição a luz UV em relação a linhagem selvagem ($P < 0,001$) (Figura 21B). Estes resultados sugerem que a proteína DdbA esta envolvida no reparo ao dano ao DNA causado por luz UV e 4-NQO (um agente mimético de luz UV).

Figura 21: Os fenótipos da linhagem mutante $\Delta ddbA$ na presença de agentes causadores de dano ao DNA. **(A)** Fenótipo da linhagem selvagem e o mutante $\Delta ddbA$ em YUO e YUO acrescido de diferentes agentes causadores de dano ao DNA (4NQO 0,25μg/mL, HU 10mM/mL e CPT 75μM/mL) incubados por 48 horas a 37°C. **(B)** Fenótipo de conídios quiescentes da linhagem $\Delta ddbA$ na presença de luz UV. **(C)** Fenótipo de conídios germinantes da linhagem $\Delta ddbA$ na presença de luz UV ($p < 0,05$).

Na realização de um segundo teste onde analisamos a expressão do gene *ddbA*, a linhagem selvagem (GR5) germinou durante 16 horas na ausência de droga e depois foi transferida para um novo meio de cultura (YUU) adicionado de concentrações específicas de droga e incubados por 30, 60, 120 e 240 minutos. Como controles repetiram-se os mesmos tempos sem adição de droga, sendo que após esses tempos, o RNA foi isolado para análise do perfil de expressão dos genes *ddbA* e *tubC*.

A expressão do gene *ddbA* mostrou-se duas vezes mais elevada depois de 240 minutos na presença de CPT e sete vezes mais elevada na presença de MMS, e nos tempos 60 e 120 minutos, quatro vezes mais expresso na presença de BLEO e três vezes na presença de 4NQO respectivamente (Figura 22B).

Outro experimento foi realizado com a finalidade de medir a expressão do gene *ddbA* após a exposição à luz UV. Durante a recuperação do fungo após indução do dano, o gene *ddbA* mostrou um aumento gradativo em sua expressão e seu ponto máximo de expressão foi de 3 vezes após 150 minutos de recuperação (Figura 22A).

Esses resultados reforçam a hipótese de que o gene *ddbA* está envolvido na resposta ao dano ao DNA, mais especificamente na resposta ao dano causado por luz UV e 4-NQO e embora não tenha apresentado fenótipo de sensibilidade durante o crescimento da colônia na presença de MMS e BLEO, a proteína DdbA pode também estar envolvida no processo do reparo de quebra dupla fita do DNA.

Figura 22: Os valores da expressão do gene *ddbA* na presença de drogas. **(A)** O micélio foi incubado na ausência de droga por 4 horas à 37° C, exposto a luz UV e recolocado em meio YUU por 0, 20, 60, 120 e 150 minutos. **(B)** O micélio foi incubado na ausência e na presença de CPT 25 µmol/L, MMS 0,003%, BLEO 0,06 µg/mL e 4NQO 0,25 µg/mL por 30, 60 120 e 240 minutos. “Real-Time” RTPCR foi o método utilizado para quantificar o RNAm. Os resultados foram normalizados usando os valores C_T obtidos pela amplificação do RNAm de *tubC* na mesma amostra. A relação quantitativa da expressão do gene *ddbA* e *tubC* foi determinada por uma curva padrão. Os valores representam o número de cópias de RNAm em relação a linhagem selvagem não tratada com droga (representada como 1.00).

4.2.4. O papel do gene *ddbA*^{DDb1} na resposta celular ao estresse oxidativo

Sabe-se que modificações oxidativas no DNA são freqüentes em humanos e têm sido implicadas como um importante mecanismo que leva ao envelhecimento precoce, diabetes e carcinogênese (POULSEN, 2005). Pacientes XP exibem em suas células, elevados níveis de espécies reativas ao oxigênio (ROS). Sendo assim, aqui nós investigamos a influência do estresse oxidativo no crescimento da linhagem mutante $\Delta ddbA$ e se a expressão deste gene é afetado na presença de agentes que causam o estresse oxidativo.

Quando comparados com a linhagem selvagem, o crescimento do mutante $\Delta ddbA$ não é afetado por H_2O_2 , paraquat e menadiona (resultados não apresentados). No entanto, a expressão do gene *ddbA* mostrou-se substancialmente

elevado quando a linhagem selvagem foi incubada na presença de agentes indutores de estresse oxidativo (Figura 23).

A expressão do gene *ddbA* mostrou-se elevada de 30 a 90 vezes após 20 e 60 minutos de crescimento na presença de H_2O_2 (5, 25 e 100 mmol/L) e quando na presença de menadiona (5mM) e paraquat (5mM e 10mM), também por 60 minutos, a expressão foi elevada a 160 e 70 vezes, respectivamente (Figura 23). Para cloreto de cádmio (0.1 e 0.2 m/M) e sulfato de zinco (0.25 m/M) a expressão do gene *ddbA* mostrou-se elevada de 40 a 80 vezes.

Esses resultados indicam que embora não haja inibição do crescimento radial da colônia da linhagem mutante $\Delta ddbA$ na presença de agentes indutores do estresse oxidativo comparado com o tipo selvagem, o gene *ddbA* é altamente expresso durante o estresse oxidativo em *A. nidulans*.

Figura 23: Os valores da expressão do gene *ddbA* na presença de agentes causadores de estresse oxidativo. Em todos os tratamentos a linhagem selvagem GR5 foi induzida por 60', exceto para H_2O_2 que também foi induzida por 20'. As concentrações utilizadas foram: H_2O_2 20' e 60' (5, 25 e 100mM), Menadiona (0,1 e 0,5mM), Paraquat (5 e 10mM), Fe_2SO_4 (0,25 e 0,5mM), $CdCl_2$ (0,1 e 0,2mM), e $ZnSO_4$ (0,1 e 0,25mM). "Real-Time" RTPCR foi o método utilizado para quantificar o mRNA. As amostras foram normalizadas usando os valores C_T obtidos pela amplificação do RNAm de tubC na mesma amostra. A relação quantitativa da expressão dos genes *chkA*^{CHK1}, *chkB*^{CHK2} e tubC foi determinada por uma curva padrão. Os valores representam o número de cópias de RNAm em relação a linhagem selvagem não tratada com droga (representada como 1.00).

4.2.5. O papel do gene *ddbA*^{DDB1} no desenvolvimento asssexual e sexual de *A. nidulans*

Em *D. melanogaster*, DDB1 mostrou-se essencial para o desenvolvimento (TAKATA et al., 2004). Em *A. nidulans* os resultados mostraram que o mutante $\Delta ddbA$ crescido em meio completo, não apresentou nenhuma redução no tamanho

da colônia em relação a linhagem selvagem, e a sua produção de esporos assexuais não foi afetada. Os resultados também mostraram que não houve formação de clestotécios viáveis por “self-cross” (resultados não mostrados).

Um experimento para sincronizar o crescimento foi elaborado para verificar a possibilidade da indução do gene *ddbA* durante a conidiação na linhagem selvagem. Usando “Real-Time” RT-PCR, verificamos que o transcrito do gene *ddbA* aumentou de 7 a 8 vezes em relação ao tempo zero após 3 e 4 horas de indução (Figura 24A) coincidindo inicialmente com a formação dos conidióforos e após 8 horas do período de indução (o qual finaliza com o aparecimento de fiáides e esporos), os transcritos apresentaram elevação de 5 vezes (Figura 24A).

Para quantificar a expressão do gene *ddbA* durante o desenvolvimento sexual, uma cultura teve seu crescimento sincronizado de modo a obter células no mesmo estágio do desenvolvimento e transferidos do meio líquido para placa com meio de cultura sólido através de uma membrana de filtro (BOYLAN et al., 1987). O RNA foi isolado em tempos distintos depois do período de indução e o RNA pertencente a cada estágio foi submetido ao “Real-Time RT-PCR”.

O resultado mostra um constante aumento, de 3 a 7 vezes no período de 24 para 120 horas (Figura 24B). Estes resultados sugerem que a proteína DdbA pode estar envolvido nos desenvolvimentos assexual e sexual de *A. nidulans*.

Figura 24: Os valores da expressão do gene *ddbA* durante os desenvolvimentos assexual e sexual. (A) Representa os níveis de expressão do RNAm *ddbA* durante o desenvolvimento assexual de *A. nidulans* e em (B) estão representados os níveis de expressão do RNAm *ddbA* durante o desenvolvimento sexual de *A. nidulans*. “Real-Time” RTPCR foi o método utilizado para quantificar o RNAm. As amostras foram normalizadas usando os valores C_T obtidos pela amplificação do RNAm de *tubC* na mesma amostra. A relação quantitativa da expressão do gene *ddbA* e *tubC* foi determinada por uma curva padrão. Os valores representam o número de cópias de RNAm em relação a linhagem selvagem não tratada com droga (representada como 1.00).

4.2.6. A localização celular da proteína DdbA

Alguns estudos em fibroblastos humanos mostram que a proteína DdbA está localizada predominantemente no citoplasma, porém, quando as células são induzidas ao reparo ao dano ao DNA causado por luz UV, esta proteína migra para o núcleo (LIU et al., 2000). Entretanto, em *S. pombe*, DDB1p está localizado no núcleo independentemente dos danos causados por luz UV (ZOLEZZI et al 2002). A fim de investigar a localização celular da proteína DdbA durante o dano ao DNA, foi construída uma linhagem em que o gene *ddbA* esta fusionado com o promotor induzível do gene da álcool desidrogenase (*alcA*) de *A. nidulans*. A expressão de proteínas sob o controle do promotor *alcA* pode ser reprimida em meio contendo glicose, induzida em meio contendo glicerol e super induzida na presença de glicerol e etanol (2%) ou treonina (100 mmol/L).

Para a localização da proteína DdbA nos germinantes, conídios da linhagem *alcA::gfp::ddbA* foram incubados em condições de indução (MM glicerol + etanol 2%) por 18 horas a 30°C, na ausência e na presença de 4NQO 0,03 µg/mL (2 horas de tratamento) e Luz UV 500J/m² para indução do dano ao DNA. Independentemente da presença de dano ao DNA, vimos que DdbA esta localizado no núcleo celular (Figura 25).

Figura 25: A localização subcelular da proteína DdbA. **(A)** Germinantes crescidos em MM glicerol + etanol 2%. **(B)** Germinantes crescidos em MM glicerol + etanol 2% tratados com 0,3 µg/mL de 4NQO por 2 horas. **(C)** Germinantes crescidos em MM glicerol + etanol 2% expostos a luz UV 500 J/m². Barras 10 µm.

4.2.7. Possíveis interações genéticas de *ddbA*^{DDB1} em *A. nidulans*

Recentemente, nós caracterizamos o gene *cshB*^{CSB} (AN7103.1) que codifica a proteína homóloga CSB de humanos, previamente nomeada de *cshA* (MALAVAZI et al., 2006a). Sabe-se que o gene CSB está envolvido na TCR, uma subvia de NER, fornecendo a célula um mecanismo para remover lesões que causam bloqueio em genes transcripcionalmente ativos (DE WAARD et al, 2003). Mutações em humanos nos genes CSA e CSB causam a Síndrome de Cockayne, uma rara desordem

herdada caracterizada por sensibilidade a luz UV e anormalidades neurológicas (DE WAARD et al., 2004). Sabe-se também que DDB1 está envolvida em GGR, outra subvia de NER, facilitando a identificação de lesões pouco reconhecidas pelo complexo XPC-hHR23B como os dímeros de ciclobutano (HWANG et al., 1996; FRIEDBERG et al., 2006), e DDB1 também atua como um cofator do complexo E3 ligase que está associado com as proteínas CSA e CSB (GROISMAN et al., 2003).

Para compreender a função da proteína DdbA na resposta ao dano ao DNA por NER no fungo filamentoso *A. nidulans*, nós construímos um duplo mutante $\Delta ddbA \Delta cshB^{CSB}$ e verificamos sua sensibilidade a agentes que causam dano ao DNA.

O duplo mutante mostrou maior sensibilidade a 4-NQO do que aquelas apresentadas pelos seus parentais, indicando que ambas as vias estão colaborando paralelamente para reparar o dano ao DNA causado por 4-NQO. Em contraste, o duplo mutante mostrou ser sensível como o seu parental $\Delta cshB^{CSB}$ à BLEO, sugerindo que o efeito observado para 4-NQO é específico para essa interação (Figura 26A).

Para melhor entender as vias em que os genes *ddbA* e *cshB* estão participando, conídios quiescentes e germinantes foram expostos a luz UV. Quando os conídios foram expostos nas doses de 150J/m² e 200J/m² de luz UV, ainda quiescentes, os resultados indicam que as proteínas DdbA e CshB atuam em sinergismo (Figura 26B), diferentemente dos conídios germinantes, onde os genes *ddbA* e *chkB* se mostraram epistáticos nas doses de 50J/m², 100J/m² e 150J/m² (Figura 26C).

Figura 26: Interações genéticas entre os genes *ddbA* e *cshB* de *A. nidulans*. (A) Inibição do crescimento radial das linhagens $\Delta ddbA$, $\Delta cshB$ e o duplo mutante $\Delta ddbA;\Delta cshB$ na presença de 0,25 µg/mL de 4-NQO e 1,0 µg/mL de Bleomicina 37°C por 48 horas. (B) Viabilidade das linhagens $\Delta ddbA$, $\Delta cshA$ e o duplo mutante $\Delta ddbA;\Delta cshB$ após indução do dano ao DNA determinada por diferentes doses de luz UV em esporos quiescentes. (C) Viabilidade das linhagens $\Delta ddbA$, $\Delta cshB$ e o duplo mutante $\Delta ddbA;\Delta cshB$ após indução do dano ao DNA determinada por diferentes doses de luz UV em esporos germinantes ($p < 0,05$).

A fosforilação da Histona H2AX é uma das respostas mais adiantadas na presença de dano ao DNA e a fosforilação do C-terminal da H2AX por ATM/ATR durante a germinação de leveduras, esta evolutivamente conservada na resposta a DSB (VIDANES et al., 2005). De Souza et. al. (2006) trocaram uma serina conservada no C-terminal da histona H2AX de *A. nidulans* por uma alanina, gerando assim um mutante H2AX-S129A que é viável e sensível a Diepoxietano (DEO) e

CPT. Aqui nós construímos um duplo mutante $\Delta ddbA$ H2AX-S129A e o isolamos pela sensibilidade a 4-NQO e BLEO.

Na presença dos agentes mutagênicos 4-NQO, BLEO e MMS o duplo mutante $\Delta ddbA$;H2AX-S129A mostrou maior sensibilidade a aquela apresentada pelos seus parentais na presença destes mesmos agentes, indicando interação sinérgica entre DdbA e H2AX (Figura 27A) e diferentemente da interação apresentada para os agentes mutagênicos o duplo mutante $\Delta ddbA$;H2AX-S129A mostrou a mesma sensibilidade a aquela apresentada pelos seus parentais indicando epistasia durante a resposta ao dano ao DNA causado por luz UV quando conídios germinantes foram expostos nas doses de 50, 100 e 150 J/m² (Figura 27C), no entanto quando a dose é aumentada (200 e 250 J/m²) a linhagem H2AX-S129A é mais sensível (Figura 27C). Estes resultados sugerem um possível papel da histona H2AX no mecanismo de ação do *ddbA*.

Figura 27: Interações genéticas entre *ddbA* e H2AX-S129A de *A. nidulans*. **(A)** Inibição do crescimento radial das linhagens $\Delta ddbA$ e H2AX-S129A e o duplo mutante $\Delta ddbA$;H2AX-S129A na presença de 0,25 µg/mL de 4-NQO e 1,0 µg/mL de Bleomicina 37°C por 48 horas. **(B)** Viabilidade das linhagens $\Delta ddbA$, H2AX-S129A e o duplo mutante $\Delta ddbA$;H2AX-S129A após indução do dano ao DNA determinada por diferentes doses de luz UV em esporos quiescentes. **(C)** Viabilidade das linhagens $\Delta ddbA$, H2AX-S129A e o duplo mutante $\Delta ddbA$;H2AX-S129A após indução do dano ao DNA determinada por diferentes doses de luz UV em esporos germinantes.

Verificamos também possíveis interações entre *atmA*^{ATM}, *uvsB*^{ATR} e *nkuA*^{KU70} pela construção de duplos mutantes com a linhagem $\Delta ddbA$. Os dois primeiros são os homólogos das PIKKS (ATM/ATR) que funcionam como reguladores centrais da resposta ao dano ao DNA em células eucarióticas (HOFMAN & HARRIS 2000; MALAVAZI et al., 2006) e *nkuA*, um homólogo de KU70 de humanos essencial para NHEJ nas DSBs (NAYAK et al., 2006). Os duplos mutantes $\Delta ddbA;\Delta atmA$, $\Delta ddbA;\Delta nkuA$ e $\Delta ddbA;\Delta uvsB$ não apresentaram nenhum tipo de interação com seus parentais em concentrações subinibitórias de 4-NQO, HU, CPT e MMS (Figuras 28A, B, e C). No entanto, para luz UV o gene *ddbA* mostrou estar suprimindo *uvsB* quando conídios quiescentes e germinantes foram expostos a luz UV (Figura 29A).

Figura 28: O crescimento radial das linhagens parentais $\Delta ddbA$, $\Delta atmA$, $\Delta nkuA$, $\Delta uvsB$ e duplos mutantes na presença de agentes mutagenicos. **(A)** $\Delta ddbA$, $\Delta uvsB$ e duplo mutante. **(B)** $\Delta ddbA$, $\Delta atmA$ e duplo mutante. **(C)** $\Delta ddbA$, $\Delta nkuA$ e duplo mutante.

Figura 29: Viabilidade dos conídios das linhagens $\Delta ddbA$, $\Delta atmA$, $\Delta nkuA$ e $\Delta uvsB$ e duplo mutantes. **(A)** Conídios quiescentes. **(B)** Conídios germinantes. **(C)** Fenótipo da linhagem $\Delta ddbA \Delta uvsB$ e seus parentais na presença de drogas. Os resultados expressos são a média $\pm$ desvio padrão de quatro experimentos independentes realizados em duplicata cada um. Diferenças estatísticas foram verificadas pelo teste ANOVA fator único seguido, quando significantes, do teste Student Newman-Keuls de comparação múltipla. $P < 0,05$ foi considerado significativo.

4.2.8. Discussão

NER é um importante mecanismo de reparo ao dano ao DNA induzido por luz UV e/ou agentes químicos carcinogênicos, tornando-se assim, uma das principais vias de defesa contra a carcinogênese. Defeitos em NER estão associados com diversos distúrbios genéticos como XP, caracterizado por uma predisposição ao câncer de pele de origem queratinosa (MAGNALDO & SARASIN, 2004), e CS caracterizado por sensibilidade a UV e envelhecimento prematuro, sendo que CS

esta freqüentemente associada ao XP (FRIEDBERG et al., 2006). Foram identificados e clonados sete grupos de complementação genética de NER deficientes de XP (XPA-XPG) e dois de CS (CSA e CSB) (ITOH, 2006). Células aonde XPE esta inativado carecem de sua atividade UV-DDB do complexo DNA/DDB (CHU & CHANG 1988) e mutações que resultam na eliminação da atividade DDB causa o distúrbio genético XP (SUGASAWA, 2006).

Em células humanas DDB2 interage com DDB1 ainda no citoplasma migrando para o núcleo na presença de dano ao DNA causado por luz UV (SUGASAWA, 2006). Estudos mostraram que não é simplesmente o heterodímero DDB1/DDB2 que interage ao DNA estimulando GGR a reparar o dano causado por luz UV, existem também um grande complexo de proteínas que possuem atividade ubiquitina [E3 culina 4A (Cul 4A)/subunidade Roc 1 RING/COP9 signalossomo (CSN)] (GROISMAN et al. 2003; SUGASAWA et al. 2005). Este complexo tem como alvo XPC, um sensor de dano ao DNA do mecanismo GGR. A ubiquitinação de XPC aumenta sua habilidade de permanecer associada à cromatina (SUGASAWA et al. 2005). Em contraste, DDB2, um outro alvo de DDB1-Cul4A, é ubiquitinado *in vitro* pelo DDB1-Cul4A e rapidamente degradado após o dano induzido por UV (CHEN et al 2001). A ubiquitinação de DDB2 reduz a habilidade de ligação do complexo DDB1-Cul4A de se ligar ao DNA danificado sendo assim necessário para o reparo de danos induzidos por luz UV (SUGASAWA et al. 2005).

Existem outras funções de DDB1 que são independentes de NER. Em *S. pombe*, DDB age como um adaptador para o complexo Cul4A ubiquitina ligase promovendo a degradação de uma ribonucleotideo reductase SPD1 (BONDAR et al., 2004; HOLMBERG et al. 2005; LIU et al 2003), e quando as células são expostas à luz UV ou radiação ionizante, DDB promove a degradação de Cdt1, um componente do complexo de pré-replicação que se une ao DNA durante G1 para permitir o inicio da síntese de DNA (ARIAS & WALTER, 2005; HIGA et al., 2003; HU et al., 2004; HU & XIONG, 2006; NISHITANI et al., 2006; SENGU et al., 2006).

Nós identificamos através de uma pesquisa no banco de dados da sequência de *A. nidulans*, um homólogo da proteína DDB1 neste fungo denominado como *ddbA*. Da mesma forma, procuramos um homólogo da proteína DDB2, o qual não foi identificado. Para entender mais sobre *ddbA* e suas funções nós fizemos diversos experimentos, incluindo a deleção de *ddbA*, localização da proteína com fusão da proteína gfp (*DdbA::gfp::pyrG*), e análise de expressão do RNAm em várias

condições deletérias ao DNA. A linhagem $\Delta ddbA$ mostrou ser mais sensível ao dano causado por luz UV e agentes miméticos de UV, como 4-NQO. Em *S. pombe* a deleção de DDB1 mostrou ser mais sensível a agentes causadores de dano ao DNA como MMS e luz UV além de defeitos na segregação cromossômica e baixa progressão da fase S do ciclo celular (ZOLEZZI et al., 2002; BONDAR et al., 2004). Em células somáticas de *D. melanogaster*, DDB1 tem um papel inicial na reposta ao dano ao DNA causado por MMS e estabilidade genômica (SHIMANOUCHI et al. 2006). A redução da proteína DDB1 nas células humanas reduz a sua habilidade de reparar os dímeros de ciclobutano causados pela luz UV, no entanto os fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona continuam sendo reparados (LI et al., 2006).

A proteína DDB está localizada no núcleo na presença ou na ausência do dano ao DNA causado por luz UV ou 4-NQO. No entanto, nós não fomos capazes de identificar um suposto sinal de localização nuclear das seqüências de aminoácidos da proteína DdbA. Quando uma fusão da proteína DDB1::gfp foi temporariamente expressa em altos níveis a partir de um plasmídeo em fibroblastos humanos, ela foi localizada predominantemente no citoplasma, embora em alguns estudos esta proteína foi vista no núcleo (LIU et al 2000). Transitoriamente, quando as células são expostas a luz UV, DDB1::gfp é super expressa no citoplasma e enviada para o núcleo (LIU et al 2000). Em *S. pombe* Ddb1 mostrou estar localizado no núcleo, na ausência ou presença de dano ao DNA causado por luz UV (ZOLEZZI et al 2002). Estes resultados sugerem que o homólogo de DDB1 pode estar constitutivamente presente no núcleo, associado com a cromatina junto ao DNA. Assim é possível sugerir que DDB::gfp está localizado no núcleo na ausência de dano no DNA, e somente se junta a cromatina na presença do dano.

Experimentos de septação, crescimento polar e anormalidade no ponto de checagem da fase S do mutante *ddbA* não mostraram nenhum fenótipo na cepa mutante. Entretanto, a análise da expressão do RNAm *ddbA* mostrou que agentes causadores de dano ao DNA podem induzir moderadamente a expressão do gene *ddbA*. Em contraste, nós não vimos nenhum fenótipo na linhagem $\Delta ddbA$ na presença de agentes que causam estresse oxidativo. No entanto, o RNAm de *ddbA* está sendo fortemente expresso na presença destes agentes. 8-hydroxydeoxyguanosina (8-OhdG), uma forma de guanina oxidada, que causa estresse oxidativo podendo produzir mutações do tipo transversões (G-C para T-A) (para revisão KOHEN & NYSKA 2002) e bases oxidadas bem como a quebra de fita

simples induzidas por ROS, são reparados predominantemente por BER (BAZILAI e YAMAMOTO 2004). O reparo da hélice distorcida como os cis, syn ciclobutano dímeros de timina (T-T), causados por luz UV estão mais associados com NER (EVANS et al 2004). No entanto, existem evidências que lesões menores como 8-OhdG e timina glicol podem ser utilizados como substratos para NER, podendo refletir um amplo substrato para essa via de reparo (EVANS et al 2004). É também concebível que a sinalização do estresse oxidativo não está induzindo o gene *ddbA* e sim ativando o ponto de checagem do ciclo celular, tal como a ATM/ATR, e conseqüentemente estes estão ativando a maquinaria de reparo do dano no DNA e reparo do estresse oxidativo a nível transcricional. Células de pacientes AT tem uma redução significativa da capacidade antioxidante, e deficientes ATM são mais sensíveis para o estresse oxidativo em relação às células normais (Barzilai et al 2002). Resultados preliminares em nosso laboratório mostraram que os homólogos de ATM/ATR inativados (*atmA* e *uvsB*, respectivamente) tem um aumento na susceptibilidade a H₂O₂ (MALAVAZI et al, 2007).

Nós também observamos um aumento na expressão do RNAm de *ddbA* durante o crescimento sexual e assexual sugerindo que *ddbA* exerce um papel durante meiose ou desenvolvimento. Holmberg et al (2005) mostraram que a degradação do complexo DDB/Csn1/Culina4-mediated Spd1 é essencial para as células se diferenciarem durante a meiose. Em *D. melanogaster*, a super expressão de dsRNA D-DDB1 é induzida por tumores e em alguns estudos, onde D-DDB1 foi deletado, as moscas morreram indicando que D-DDB1 é essencial para o desenvolvimento em organismos multicelulares (TAKATA et al., 2004).

Os genes DDB1 e ATR são ativados por radiação UV e são recrutados para os sítios de dano ao DNA (LOVEJOY et al 2006). Existem efeitos aditivos quando o duplo mutante $\Delta ddbA \Delta uvsB^{ATR}$ foi exposto a luz UV. Efeitos aditivos foram também observados para o duplo mutante $\Delta atmA^{ATM} \Delta ddbA$ quando conídios germinantes foram expostos a luz UV. Estas interações implicam *UvsB^{ATR}* e *AtmA^{ATM}* no funcionamento de DdbA em *A. nidulans*. Interações sinérgicas interessantes foram também observadas entre $\Delta ddbA$ e uma forma alterada do gene que codifica o variante *H2AX-S129A* da histona H2AX. A fosforilação de H2AX é um das primeiras respostas ao dano ao DNA e a fosforilação do C-terminal de H2AX por ATM/ATR em *S. cerevisiae* é uma resposta conservada evolutivamente as DSBs (Vidanes et al.

2005). Para o nosso conhecimento, não existe informação prévia em outros sistemas envolvendo estes genes e homólogos de DDB1.

Além do funcionamento da sub-via GGR do NER, DDB1 tem também um papel em TCR (GROISMAN et al. 2003). Assim, nós investigamos uma possível interação entre DdbA e CshB (AN7103.1) que codifica o homólogo CSB da proteína da síndrome de Cockayne (MALAVAZI et al. 2006). Interessantemente, nós observamos sinergismo entre as duas mutações quando conídios quiescentes dos mutantes parentais e do duplo mutante foram expostos a luz UV, e também durante crescimento em presença de 4-NQO. Estas observações indicam que ambas sub-vias, GGR e TCR, estão colaborando sinergisticamente para suprimir o dano ao DNA associado à luz UV e 4-NQO.

Groisman et al. (2003) mostraram que CSA, uma proteína que contém sete repetições WD-40, é parte de um complexo E3-ubiquitina ligase que consiste das proteínas DDB1, Cul4A e Roc1. A proteína CSB é uma ATPase DNA-dependente (CITTERIO et al. 1998) que tem homologia com a família SWI2/SNF2 de enzimas remodeladoras de cromatina dependentes de ATP (EISEN et al., 1995). Kamiuchi et al. (2002) mostraram que CSA é translocado da matriz nuclear numa forma dependente de UV e CSB, onde co-localiza com a RNA polimerase II. Recentemente, Fousteri et al. (2006) revelou uma interação UV-dependente de lesões paralisadas ("stalled") com o complexo CSB, CSA-DDB1 E3-ub ligase/CSN, proteínas relacionadas a TCR e remodeladores de cromatina. Estes autores mostraram que CSA e CSB têm papéis distintos na formação do complexo TCR: CSB é um pré-requisito para a montagem de proteínas NER e histona acetiltransferase (HAT) p300 para a RNA polimerase II "stalled", enquanto CSA funcional (em adição a CSB) é necessária para o recrutamento das proteínas de ligação ao nucleossoma HMGN1, XAB2 e TFIIS. Estes estudos proporcionam uma ligação molecular entre o reconhecimento ao dano, a remodelagem a cromatina e o NER. Nossos dados sugerem que DdbA e CshB estão diretamente colaborando durante o dano ao DNA.

Em conclusão, os nossos dados são consistentes com a possibilidade que DdbA está envolvido na resposta ao dano ao DNA em *A. nidulans* através de NER. UvsB^{ATR}, AtmA^{ATM}, H2AX e CshB^{CSB} parecem ter um papel importante nas interações biológicas de DDB porque os duplos mutantes correspondentes com $\Delta ddbA$ têm deficiências em diversos aspectos da resposta ao dano ao DNA.

Considerando o fato que não existe um homólogo de DDB1 em *S. cerevisiae*, *A. nidulans* pode proporcionar um sistema modelo atraente para a elucidação da função de DDB1 em células eucarióticas.

- A Caracterização dos genes *chkA* e *chkB* em *A. nidulans* mostrou que o *chkA* está envolvido no reparo ao dano ao DNA causado por HU e ambos atuam sinergisticamente no reparo ao dano ao DNA causado por luz UV quando esporos quiescentes e germinantes foram expostos a altas doses.
- Ocorre um aumento na expressão dos genes *chkA* e *chkB* na presença de drogas que causam dano ao DNA e estresse oxidativo principalmente Menadiona indicando que apesar de não apresentarem um fenótipo de sensibilidade a agentes que causam estresse oxidativo, as proteínas ChkA e ChkB podem estar envolvidas no reparo do dano ao DNA e na resposta ao estresse oxidativo.
- Ocorre um aumento na expressão dos genes *chkA* e *chkB* durante o ciclo sexual de *A. nidulans* sugerindo o envolvimento destes durante a meiose.
- A análise dos duplos mutantes entre $\Delta atmA$, $\Delta chkA$, $\Delta chkB$ e $\Delta uvsB$ na presença do dano ao DNA causado por drogas e/ou luz UV, mostrou a possibilidade de ChkA e ChkB estarem posicionados abaixo de AtmA e UvsB na via do ponto de checagem do ciclo celular.
- Os genes *chkA* e *chkB* estão envolvidos no estabelecimento e na manutenção do crescimento polarizado em *A. nidulans* e atuam sinergisticamente com os genes $\Delta atmA$ e $\Delta uvsB$ indicando que estas proteínas tem funções redundantemente complementares.
- A caracterização funcional do gene *ddbA*^{DDB1} mostrou que este apresenta funções no reparo ao dano ao DNA causados por luz UV quando os esporos foram germinados e pelo agente mimético de UV (4NQO) em *A. nidulans*.
- Ocorre um aumento na expressão do gene *ddbA* durante as respostas ao estresse oxidativo e agentes causadores de dano ao DNA como luz UV, MMS, BLEO, 4NQO e HU.

- O gene *ddbA* está envolvido no desenvolvimento assexual e sexual de *A. nidulans*.
- A proteína DdbA está localizada no núcleo independente da existência do dano ao DNA.
- Existe interação sinérgica entre *ddbA* e *cshB* no reparo por NER induzido por miméticos de UV (4NQO) e epistático quando esporos germinantes são induzidos por luz UV.
- Existe interação sinérgica entre *ddbA* e *H2AXS129A* quando dano foi induzido por miméticos de UV (4NQO), BLEO e MMS e ainda epistático quando esporos germinantes são induzidos por luz UV entre 50, 100 e 150 J/m².

- ABRAHAM, R. T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. **Genes Dev.**, v.15, p.2177-96, 2001.
- ABRAHAM, R. T. Checkpoint signaling: epigenetic events sound the DNA strand breaks alarm to the ATM protein kinase. **Bioessays**, v.25(7), p.627-30, 2003.
- AHN, J., URIST, M., PRIVES, C. The Chk2 protein kinase. **DNA Repair** v. 3 p. 1039-1047, 2004.
- ALLEN, J. B.; ZHOU, Z; SIEDE, W.; FRIEBERG, E. C.; ELLEDGE, S. J. The Sad1/Rad53 protein kinase controls multiple check- points and DNA damage-induced transcription in yeast. **Genes Dev.**, v. 8, p. 2401-2415, 1994.
- ARATA, Y., FUJITA, M., OHTANI, K., KIJIMA, S., KATO, J. Cdk2-dependent and -Independent Pathways in E2F-mediated S Phase Induction. **J. of Biological Chemistry**. v. 275, p. 6337–6345, 2000.
- ARAÚJO, S. J., NIGG, E. A., WOOD, R. D. Strong functional interactions of TFIIH with XPC and XPG in human DNA nucleotide excision repair, without a preassembled repairosome. **Mol. Cell. Biol.** v. 21 p. 2281-2291. 2001.
- ARIAS, E. E., WALTER, J. C. Replication-dependent destruction of Cdt1 limits DNA replication to a single round per cell cycle in *Xenopus* egg extracts. **Genes Dev** v. 19, p. 114-126, 2005.
- BABUDRI, N., MARINI, A., MATMATI, N., MORPURGO, G. The *uvsC* and *uvsE* genes of *Aspergillus nidulans* are not required for the mutagenic repair of UV damage. **Mol Gen Genet.** v. 259, p. 130-2, 1998.
- BARTEK, J., LUKAS, J. Mammalian G1- and S-phase checkpoint in response to DNA damage. **Curr. Opin. Cell Biol.** v. 13, p. 738-747, 2001.
- BARTEK, J., LUKAS, J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. **Cancer Cell**, v. 3 p. 421-429, 2003.
- BARZILAI, A., ROTMAN, G., SHILOH, Y. ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. **DNA repair** v. 1, p. 3-25, 2002.
- BARZILAI, A., YAMAMOTO, K. I. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair** v. 3, p. 1109-1115, 2004.
- BASSING, C. H.; ALT, F. W. The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. **DNA Repair.**, v. 3, p. 781-96, 2004.
- BAUDIN, A.; OZIER-KALOGEROPOULOS, O.; DENOUEL, A.; LACROUTE, F.; CULLIN, C. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, p. 3329-3330, 1993.

BEGLEY, T. J., SAMSON, L. D. AlkB mystery solved: oxidative demethylation of N1-methyladenine and N3-methylcytosine adducts by a direct reversal mechanism. **Trends in Biochemical Sciences** v. 28, 2003.

BERGEN, L. G., MORRIS, N. R. Kinetics of the nuclear division cycle of *Aspergillus nidulans*. **J. Bacteriol.** v. 156 p. 155-160, 1983.

BODDY, M. N., FURNARY, B., MONDESERT, O., RUSSELL, P. Replication checkpoint enforced by kinases cds1 and chk1. **Science** v. 280 p. 909-912, 1998.

BONDAR, T., PONOMAREV, A., RAYCHAUDHURI, P. Ddb1 is required for the proteolysis of the *Schizosaccharomyces pombe* replication inhibitor Spd1 during S phase and after DNA damage. **J. Biol. Chem.** v. 179, p. 9937-9943, 2004.

BOYLAN, M.T., MIRABITO, P. M., WILLETT, C. E., ZIMMERMAN, C. R., TIMBERLAKE, W. E. Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. **Mol Cell Biol** v. 7 p. 3113-3118, 1987.

BRONDELLO, J. M., BODDY, M. N., FURNARI, B., RUSSELL, P. Basis for the checkpoint signal specificity that regulates Chk1 and Cds1 protein kinases. **Mol. Cell Biol.** v. 19 p. 4262-4269, 1999.

BRUSCHI, G. C. M.; SOUZA, C. C.; FAGUNDES, M. R. V. Z. K.; DANI, M. A. C.; GOLDMAN, M. H. S.; MORRIS, N. R.; LIU, L.; GOLDMAN, G. H. Sensivity to camptothecin in *Aspergillus nidulans* identifies a novel gene, *scaA⁺*, related to the cellular DNA damage response. **Mol. Gen. Genomics**, 265, p.264-275, 2001.

BUERMEYER, A. B., DESCHÊNES, S. M., BAKER, S. M., AND LISKAY, R. M., Mammalian DNA mismatch repair. **Annual Review of Genetics** V. 33 p. 533-564, 1999.

CASSELTON, L.; ZOLAN, M. The art and design of genetic screens; filamentous fungi. **Nature Rev.**, v. 3, p. 683-697, 2002.

CHAE, S. K., KAFER, E. *uvr1* mutants defective in UV mutagenesis define a fourth epistatic group of *uvr* genes in *Aspergillus*. **Curr. Genet.**, v. 24, p. 67-74, 1993.

CHAUVEROCHE, M. K., GHIGO, J. M., D'ENFERT, C. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Nucleic Acids Res.** v. 28, p. E97-E104, 2000.

CHEHAB, S. H.; MALIKZAY, A.; APPEL, M.; HALAZONETIS, T. D. CHK2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. **Genes Dev.** v. 14(3) p. 278-88, 2000.

CHEN, Y., SANCHEZ Y. Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. **DNA Repair**, v. 3 p. 1025-1032, 2004.

CHEN, X., ZHANG, Y., DOUGLAS, L., ZHOU, P. UV-damaged DNA binding proteins are targets of CUL-4A-mediated ubiquitination and degradation. **J. Biol. Chem.** v. 276: 48175-48182, 2001.

CHRISTMANN, M., TOMICIC, M. T., ROOS, W. P., KAINA, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology** v. 193, p. 3-34, 2003.

CHU, G., CHANG, E. Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA. **Science** v. 242, p. 564-567, 1988.

CICCHILLITTI, L., FASANARO, P., BIGLIOLI, P., CAPOGROSSI, M. C., MARTELLI, F. Oxidative Stress Induces Protein Phosphatase 2A-dependent Dephosphorylation of the Pocket Proteins pRb, p107, and p130. **J. Biolog. Chem.** V. 278 p. 19509–19517, 2003.

CITTERIO, E., RADEMAKERS, S., VAN DER HORST, G. T. J., VANGOOL, A. J., HOEIMAKERS, J. H. J., VERMEULEN, W. Biochemical and biological characterization of wild-type and ATPase-deficient Cockayne syndrome B repair protein. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 11844-1185, 1998

CLARKE, D. J., GIMENEZ-ABIAN, J. F. Checkpoints controlling mitosis. **Bioessays**, v.22, p.351-63, 2000.

D'AMOURS, D., JACKSON, S. P. The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 3, p. 317-327, 2002.

DE SOUZA, C. P. C., HASHMI, S.B, HORN, K. P., OSMANI, A. S. A point mutation in the *Aspergillus nidulans* *sonB*^{Nup98} nuclear pore complex gene causes conditional DNA damage sensitivity. **Genetics** v. 174, p. 1881-1893, 2006.

DE SOUZA, C. P. C., YE, X. S., OSMANI, S. A. Checkpoint defects leading to premature mitosis also cause endoreplication of DNA in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Biol. Cell**, v. 10, p. 3661-3674, 1999.

DE WAARD, H., DE WIT, J., GORGELS, T. G., VAN DEN AARDWEG, G., ANDRESSOO, J. O., VERMEIJ, M., VAN STEEG, H., HOEIJMAKERS, J. H., VAN DER HORST, G. T. Cell type-specific hypersensitivity to oxidative damage in CSB and XPA mice. **DNA Repair** v. 2 p. 13-25, 2003.

DE WAARD, H., DE WIT, J., ANDRESSOO, J. O., VAN OOSTROM, C. T. M., RIIS, B., WEIMANN, A., POULSEN, H. E., VAN STEEG, H., HOEIJMAKERS, J. H. J., VAN DER HORST, G. T. J. Different effects of CSA and CSB deficiency on sensitivity to oxidative DNA damage. **Mol. Cell. Biol.** V. 24 p. 7941-7948, 2004.

DESANY, B. A., ALCASABAS, A. A., BACHANT, J. B., ELLEDGE, S. J. Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S phase checkpoint pathway. **Genes Dev.** v. 12 p. 2956-2970, 1998.

DOONAN, J. H. Cell division in *Aspergillus*. **J. Cell Sci.**, v. 103 p. 599-611, 1992.

DUALAN, R., BRODY, T., KEENEY, S., NICHOLS, A. F., ADMON, A., LINN, S. Chromosomal localization and cDNA cloning of the genes (DDB1 and DDB2) for the p127 and p48 subunits of a human damage-specific DNA binding protein. **Genomics** v. 29, p. 62-69, 1995.

EDELMANN, L.; EDELMANN, W. Loss of DNA mismatch repair function and cancer predisposition in the mouse: animal models for human hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Am. J. Med. Genetics Part C (Semin. Med. Genet.)**, v. 129C, p. 91-99, 2004.

EISEN, J. A., SWEDER, K. S., HANAWALT, P. C. Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. **Nucleic. Acids. Res.** v. 23 p. 2715-2723, 1995.

EVANS, M. D., DIZDAROGLU, M., COOKE, M. S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research** v. 567, p. 1-61, 2004.

FAGUNDES, M. R.; FERNANDES, L. SAVOLDI, M.; HARRIS, S. D.; GOLDMAN, M. H.; GOLDMAN, G. H. Identification of a topoisomerase I mutant, *scaA1*, as an extragenic suppressor of a mutation in *scaA(NBS1)*, the apparent homolog of human nibrin in *Aspergillus nidulans* **Genetics**. V. 164(3) p. 935-45, 2003.

FAGUNDES, M. R. V. Z. K.; LIMA J. F.; SAVOLDI, M.; MALAVAZI, I.; LARSON, R. E.; GOLDMAN, M. H.; GOLDMAN G. H. The *Aspergillus nidulans npkA* gene encodes a Cdc2-related kinase that genetically interacts with the UvsB^{ATR} kinase. **Genetics**, v. 167, p. 1629-1641, 2004.

FAGUNDES, M. R. V. Z. K.; SEMIGHINI, C. P.; MALAVAZI, I. SAVOLDI, M. LIMA, J. F.; GOLDMAN, M. H. S.; HARRIS, S. D.; GOLDMAN, G. H. *Aspergillus nidulans uvsB^{ATR}* and *scaA^{NBS1}* genes show genetic interactions during recovery from replication stress and DNA damage. **Eukaryotic. Cell**, v. 4, p. 239-1252, 2005.

FALC, J., PETRINI, J. H., WIKKIAN, B. R., LUKAS J., BARTEK, J. The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. **Nat. Genet.** v. 30, p. 290-4, 2002.

FEATHERSTONE, C., JACKSON, S. P. Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? **Mutat. Res.**, v. 434(1), p. 3-15, 1999.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** v. 39, p. 783-791, 1985.

FERRARA, L., KMIEC, E. B. Targeted gene repair activates Chk1 and Chk2 and stalls replication in corrected cells. **DNA Repair** p. 422-431, 2006.

FLORES-ROZAS, H.; CLARK, D.; KOLODNAR, R. Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mismatch recognition complex. **Nature Genetics**, v. 26, p.375-378, 2000.

FORTINI, P.; PASCUCI, B.; PARLANTI, E.; D'ERRICO, M.; SIMONELLI, V.; DOGLIOTTI, E. The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. **Biochimie**, v. 85, p. 1053-71, 2003.

FOUSTERI, M., VERMEULEN, W., VAN ZEELAND, A. A., MULLENDERS, L. H. F. Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodelling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. **Mol. Cell**. v. 23, p. 471-482, 2006.

FRIEDBERG, E. C. How nucleotide excision repair protects against cancer. **Nat. Rev. Cancer** v. 1, p. 22-33, 2001.

FRIEDBERG, E. C., WALKER, G. C., SIEDE, W., WOOD, R. D., SCHULTZ, R. A., ELLENBERGER, T. DNA repair and mutagenesis. **American Society of Microbiology Press**, Second Edition, 1118 pages, 2006

GALAGAN, J. E.; CALVO, S. E.; CUOMO, C.; MA L. J.; WORTMAN, J. R.; BATZOGLOU, S.; LEE, S. I.; BASTURKMEN, M.; SPEVAK, C. C.; CLUTTERBUCK, J.; KAPITONOV, V.; JURKA, J.; SCAZZOCCHIO, C.; FARMAN, M.; BUTLER, J.; PURCELL, S.; HARRIS, S.; BRAUS, G. H.; DRAHT, O.; BUSCH, S.; D'ENFERT, C.; BOUCHIER, C.; GOLDMAN, G. H.; BELL-PEDERSEN, D.; GRIFFITHS-JONES, S.; DOONAN, J. H.; YU, J.; VIENKEN, K.; PAIN, A.; FREITAG, M.; SELKER, E. U.; ARCHER, D. B.; PENALVA, M. A.; OAKLEY, B. R.; MOMANY, M.; TANAKA, T.; KUMAGAI, T.; ASAI, K.; MACHIDA, M.; NIERMAN, W. C.; DENNING, D. W.; CADDICK, M.; HYNES, M.; PAOLETTI, M.; FISCHER, R.; MILLER, B.; DYER, P.; SACHS, M. S.; OSMANI, S. A.; BIRREN, B. W. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature**, v. 438, p. 1105-1115, 2005.

GAME, J. C. The *Saccharomyces* repair genes at the end of the century. **Mutation Research** v. 451 p. 277-293, 2000.

GASCH, A.P., HUANG, M., METZNER, S., BOTSTEIN, D., ELLEDGE, S.J., AND BROWN, P.O. Genomic expression responses to DNA-damage agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p. **Molecular and Cellular Biology** v.12, p.2987-3003, 2001.

GATEI, M., SLOPER K., SORENSEN C., SYLJUASEN R., FALCK J. Ataxiatelangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionising radiation. **J. Biol. Chem.** V. 278 p. 14806-14811, 2003.

GiGLIA-MARI, G., COIN, F., RANISH, J. A., HOOGSTRATEN, D., THEIL, A., WIJGERS, N., JASPERS, N. G. J., RAAMS, A., ARGENTINI, M., VAN DER SPEK, P. J., BOTTA, E., STEFANINI, M., EGLY, J. M., AEBERSOLD, R., HOEIJMAKERS, J. H. J., VERMEULEN, W. A new tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. **Nat. Genet.** v. 36, p. 714-719, 2004.

GOLDMAN, G. H.; KAFER, E. *Aspergillus nidulans* as a model system to characterize the DNA damage response in eukaryotes. **Fungal Genet. Biol.**, v. 41, p.428-42, 2004.

GOLDMAN, G. H.; MCGUIRE, S. L.; HARRIS, S. D. The DNA damage response in filamentous fungi. **Fungal Genet. Biol.**, v.35, p.183-95, 2002.

GROISMAN, R., POLANOWSKA, J., KURAOKA, I., SAWADA, J. I., SAIJO, M., DRAPKIN, R., KISSELEV, A. F., TANAKA, K., NAKATANI, Y. The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. **Cell** v. 113, p. 357-367, 2003.

HAN, K. L., CHAE, S. K., E HAN, D. M. The *uvrL* gene of *A. nidulans* required for UV-mutagenesis encodes a homologue to REV3, subunit of DNA polymerase zeta of yeast involved in translesion DNA synthesis. **FEMS Microbiol. Lett** v. 164 p. 13-19, 1998.

HAN, D. M., HAN, Y. J., LEE, Y. H., JAHNG, K. Y., JAHNG, S. H., CHAE, K. S. Inhibitory conditions of asexual development and their application for the screening of mutants defective in sexual development. **Kor. J. Mycol.** v. 18, p. 225–232, 1990.

HARRIS, S. D. The duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Gen. Biol.**, v. 22, p. 1-12, 1997.

HARRIS, S. D.; KRAUS, P. R. Regulation of septum formation in *Aspergillus nidulans* by a DNA damage checkpoint pathway. **Genetics**, p. 148, v. 1055-1067, 1998.

HARRIS, S., D. Morphogenesis is coordinated with nuclear division in germinating *Aspergillus nidulans* conidiospores. **Microbiology**, v. 145, p. 2747-2756, 1999.

HELLEDAY, T., LO, J., DIK, C., VAN GENT AND ENGELWARD, B. P. DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment **DNA Repair** v. 6, p. 923-935, 2007.

HELT, C. E., CLIBY, W. A., KENG, P. C., BAMBARA, R. A., O'REILLY, M. A. Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) and ATM and Rad3-related Protein Exhibit Selective Target Specificities in Response to Different Forms of DNA Damage. **J. Biol. Chem.**, V. 280, p. 1186-1192, 2005.

HIGA, L. A., MIHAYLOV, L. S., BANKS, D. P., ZHENG, J., ZHANG, H. Radiation-mediated proteolysis of CDT1 by CUL-ROC1 and CSN complexes constitutes a new checkpoint. **Nat. Cell. Biol.** v. 5, p. 1008-1015, 2003.

HIGASHITANI, A., AOKI, H., MORI, A., SASAGAWA, Y., TAKANAMI, T. *Caenorhabditis elegans* Chk2-like gene is essential for meiosis but dispensable for DNA repair. **FEBS Lett.** V. 485 p. 35-29, 2000.

HIRAO, A.; KONG, Y. Y.; MATSUOKA, S.; WAKEHAN, A.; RULAND, J.; YOSHIDA, H.; LIU, D.; ELLEDGE, S. J.; MAK, T. W.; DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase CHK2. **Science** v.10;287, p. 1824-7, 2000.

HOFMANN, A. F., HARRIS S. D. The *Aspergillus nidulans* *uvsB* gene encodes as ATM-related kinase required for multiples facets of the DNA damage response. **Genetics**, v. 154, p. 1577-1586, 2000.

HOFFSCHIR, F., DAYA-CROSCIAN, L., PETIT, P. X., NOCENTINI, S., DUTRILLAUX, B., SARASIN, A., VUILLAUME, M. Low catalase activity in xeroderma pigmentosum fibroblasts and SV40-transformed human cell lines is directly related to decreased intracellular levels of the cofactor, NADPH. **Free Radic. Biol. Med.** v. 24, p. 809-816, 1998.

HOLMBERG, C., FLECK, O., HANSEN, H. A., LIU, C., SLAABY, A., CARR, A. M., NIELSEN, O. Ddb1 controls genome stability and meiosis in fission yeast. **Genes. Dev.** v. 19, p. 853-862, 2005.

HSIEH, P. Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. **Mutation Research/DNA Repair** v. 486, p. 71-87, 2001.

HU, J. , MC CALL, M. C., OHTA, T., XIONG, Y. Targeted ubiquitination of CDT1 by the DDB1-CUL4A-ROC1 ligase in response to DNA damage. **Nat. Cell. Biol.** v. 6, p. 1003-1009, 2004.

HU, J. AND XIONG, Y. An evolutionarily conserved function of proliferating cell nuclear antigen for Cdt1 degradation by the Cul4-Ddb1ubiquitin ligase in response to DNA damage. **J. Biol. Chem.** 281: 3753-3756, 2006.

HWANG, B. J., LIAO, J. C., CHU, G. Isolation of a cDNA encoding a UV-damaged DNA binding factor defective in xeroderma pigmentosum group E cells. **Mutat. Res.** v. 362 p. 105-117, 1996.

ITOH, T. Xeroderma pigmentosum group E and DDB2, a smaller subunit of damage-specific DNA binding protein: Proposed classification of xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and ultraviolet-sensitive syndrome. **J Dermatological Science** v. 41, p. 87-96, 2006.

JACKSON, S.P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. **Carcinogenesis** 23:687, 2002.

JELINSKY, S., ESTEP, P., CHURCH, G., AND SAMSON, L. Regulatory networks Revealed by Transcriptional Profiling of Damaged *Saccharomyces cerevisiae* Cells: RPN4 Links Base Excision Repair with Proteasomes. **Molecular and Cellular Biology** v.20, p.8157-8167, 2000.

KAFER, E. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. **Adv. Genet.** v. 19, p. 33-131, 1977.

KAFER, E., E MAY, G. The *uvsF* gene region in *Aspergillus nidulans* codes for a protein with homology to Dna replication factor C. **Gene**, v. 192 p. 155-159, 1997.

KAFER, E., E MAY, G. S. Toward repair pathways in *Aspergillus nidulans*. In: NICKOLOFF, A.; HOEKSTRA, M. F. (Ed.) **DNA Damage and Repair**. Totowa: Humana Press, v. 1, cap 21, p. 477-501, 1998.

KAFER, E., E MAYOR, O. Genetic analysis of DNA repair in *Aspergillus*: evidence for different types of MMS-sensitive hyperrec mutants. **Mutation Research**, v. 161, p. 119-34, 1986.

KAMIUCHI, S., SAIJO, M., CITTERIO, E., DE JAGER, M., HOEIJMAKERS, J. H., TANAKA, K. Translocation of Cockayne syndrome group A protein to the nuclear matrix: possible relevance to transcription-coupled DNA repair. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 99, p, 201-206, 2002.

KEENEY, S., CHANG, G. J., LINN, S. Characterization of a human DNA damage binding protein implicated in Xeroderma Pigmentosum **E. J. Biol. Chem.** v. 268, p. 21293-21300, 1993.

KIM, M., KIM, H., BROWN, A. L., LEE, M., BAE, Y., PARK, J., KWAK, J., CHUNG, J. H., YUN, J. Identification of novel substrates for human checkpoint kinase Chk1 and Chk2 through genome-wide screening using a consensus Chk phosphorylation motif. **Exp. Mol. Medicine**, v. 39, p. 205-212, 2007.

KOHEN, R., NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol Pathol** 30: 620-650, 2002.

KRAUS, P. R.; HARRIS, S. D. The *Aspergillus nidulans* *snt* genes are required for the regulation of septum formation and cell cycle checkpoints. **Genetics**, v. 159, p. 557-569, 2001.

KUWAYAMA, H., OBARA, S., MORIO, T., KATOH, M., URUSHIHARA, H., TANAKA, Y. PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. **Nucl. Acids Res.** v. 30, p. e2, 2002.

LIES, C. M., CHENG, J., JAMES, S. W., MORRIS, N. R., O'CONNELL, M. J. BimA^{APC3}, a component of the *Aspergillus* anaphase promoting complex/cyclosomo, is required for a G2 checkpoint blocking entry into mitosis in the absence of NimA function. **J. Cell Science**, v. 111 p. 1453-1465, 1998.

LI J., WAN, Q. E., ZHU, Q., EL-MAHDY, M. A., WANI, G., PRAETORIUS-IBBA, M., WANI, A. A. DNA damage binding protein component DDB1 participates in nucleotide excision repair through DDB2 DNA-binding and cullin 4A ubiquitin ligase activity. **Cancer Res.** v. 66, p. 8590-8596, 2006.

LINDSAY, H. D., GRIFFITHS, D. J., EDWARDS, R. J., CHRISTENSEN, P. U., MURRAY, J. M. S-phase specific activation of Cds1 kinase defines a subpathway of the checkpoint response in *Schizosaccharomyces pombe*. **Genes Dev.** v. 12 p. 382-395, 1998.

LIU, C., POWELL, K. A., MUNDT, K., WU L., CARR, A. M., CASPARI, T. Cop9/signalosome subunits and Pcu4 regulate ribonucleotide reductase by both checkpoint-dependent and -independent mechanisms. **Genes Dev.** v. 17, p. 1130-1140, 2003.

LIU, W., NICHOLS, A. F., GRAHAM, J. A., DUALAN, R., ABBAS, A., LINN, S. Nuclear transport of human DDB protein induced by ultraviolet light. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 21429-21434, 2000.

LISBY, M.; BARLOW, J. H.; BURGESS, R. C.; ROTHSTEIN, R. Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. **Cell**, v. 18, p.699-713, 2004.

LISBY, M.; ROTHSTEIN, R. DNA damage checkpoint and repair centers. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 16, p. 328-334, 2004.

LIU, W., NICHOLS, A. F., GRAHAM, J. A., DUALAN, R., ABBAS, A., LINN S. Nuclear transport of human DDB protein induced by ultraviolet light. **J Biol Chem** v. 275, p. 21429-21434, 2000.

LOVEJOY, C. A., LOCK, K., YENAMANDRA, A., CORTEZ, D. DDB1 maintains genome integrity through regulation of Cdt1. **Mol. Cell. Biol.** v. 26, p. 7977-7990, 2006.

LUKAS, J.; LUKAS, C.; BARTEK, J. Mammalian cell cycle checkpoint: signaling pathways and their organization in space and time. **DNA Repair**, v. 3, p. 997-1007, 2004.

LYDALL, D., NIKOLSKY, Y., BISHOP, D. K., WEINERT, T. A meiotic recombination checkpoint controlled by mitotic checkpoint genes. **Nature** v. 383 p. 840 – 843, 1996.

MAGNALDO, T.; SARASIN, A. Xeroderma pigmentosum: From symptoms and genetics to gene-based skin therapy. **Cells Tissues Organs**, v. 177, p. 189-98, 2004.

MALAVAZI, I., LIMA, J. F., FAGUNDES, M. R. V. Z. K., EFIMOV, V., GOLDMAN, M. H., GOLDMAN, G. H. The *Aspergillus nidulans* *sld^{RAD50}* gene interacts with *bimE^{APC1}*, a homologue of an anaphase-promoting complex subunit. **Molec. Microbiology**, v. 57 p. 222-237, 2005.

MALAVAZI, I., SEMIGHINI, C. P., KRESS, M. R., HARRIS, S. D., GOLDMAN, G. H. Regulation of hyphal morphogenesis and the DNA damage response by the *Aspergillus nidulans* ATM homolog AtmA. **Genetics** v.173, p. 99-109, 2006.

MALAVAZI, I., SAVOLDI, M., DI MAURO, S. M., MENCK, C. F., HARRIS, S. D., GOLDMAN, M. H., GOLDMAN G. H. Transcriptome analysis of *Aspergillus nidulans* exposed to camptothecin-induced DNA damage. **Eukaryotic Cell** v. 10 p. 1688-1704, 2006a.

MALAVAZI, I., SAVOLDI, M., FERREIRA, M. E. S., SORIANI, F. M., BONATO, P. S., GOLDMAN, M. H. S., GOLDMAN, G. H., Transcriptome analysis of the *Aspergillus nidulans* *AtmA* (*ATM*, Ataxia-Telangiectasia mutated) null mutant. **Molecular Microbiology**, v. 66(1), p. 74–99. 2007.

MARTI, T. M.; KUNZ, C.; FLECK, O. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. **J. Cell. Physiol.** v. 191, p. 28-41, 2002.

MATSUDA, N., AZUMA, K., SAIJO, M., IEMURA, S., HIOKI, Y., NATSUME, T., CHIBA, T., TANAKA, K., TANAKA, K. DDB2, the xeroderma pigmentosum group E gene product, is directly ubiquylated by cullin 4A-based ubiquitin ligase complex. **DNA Repair** v. 4, p. 537-545, 2005.

MATSUOKA, S., HUANG, M., ELLEDGE, S. J., Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. **Science**, v. 282 p. 1893-1897, 2000.

MATSUOKA, S., NAKAGAWA, T.; MASUDA, A.; HARUKI, N.; ELLEDGE, S. J.; TAKAHASHI, T. Reduced expression and impaired kinase activity of a *Chk2* mutant identified in human lung cancer. **Cancer Res.** V.15;61(14) p. 5362-5, 2001.

MCKINNON, P. J. ATM and ataxia telangiectasia Second in Molecular Medicine Review Series **EMBO reports** V. 5, P. 772–776, 2004

MCLOUGHLIN, S. Cataloging electronic resources: Coriell Institute for Medical Research. Disponível em: <http://ccr.coriell.org/Sections/Collections/NIGMS/ner_pathway.aspx?PgId=256>. Acesso em 15 de Outubro de 2007.

MEMISOGLU, A., AND SAMSON, L. Base excision repair in yeast and mammals. **Mutat. Res.**v. 451 p. 39-51 (2000).

MERRILL, B. J., HOLM, C. A requirement for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae* is caused by DNA replication defects of *mec1* mutants. **Genetics** v. 153 p. 595-605, 1999.

MOL, C. D., PARIKH, S. S., PUTNAM, C. D., LO, T. P., AND TAINER, J. A. DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure** V. 28, p. 101-128, 1999.

- MOMANY, M.; TAYLOR, I. Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*: polarity, germ tube emergence and septation. **Microbiology**, v.146 p.3279-84, 2000.
- NAG, A., BONDAR, T., SHIV, S., RAYCHAUDHURI, P. The xeroderma pigmentosum group E gene product DDB2 is a specific target of cullin 4A in mammalian cells. **Mol. Cell. Biol.** v. 21, p. 6738-6747, 2001.
- NAYAK, T.; SZEWCZYK, E.; OAKLEY, C. E.; OSMANI, A.; UKIL, L.; MURRAY, S. L.; HYNES, M. J.; OSMANI, S. A.; OAKLEY, B. R. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v. 172, p. 1557-1566, 2006.
- NIIDA, H. E NAKANISHI, M. A DNA damage checkpoints in mammals. **Mutagenesis**. v. 2,1 p. 3-9, 2006.
- NINOMIYA, Y., SUZKI, K., ISHII, C., INOUE, H. highly efficient gene replacements in *Neurospora crassa* strains deficient for nonhomologous end-joining. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 12248-12253, 2004.
- NISHITANI, H., SUGIMOTO, N., ROUKOS, V., NAKANISHI, Y., SAIJO, M., OBUSE, C., TSURIMOTO, T., NAKAYAMA, K. I., NAKAYAMA, K., FUJITA, M., LYGEROU, Z., NISHIMOTO, T. Two E3 ubiquitin ligases SCF-Skp2 and DDB1-Cul4, target human Cdt1 for proteolysis. **EMBO J.** 25: 1126-1136, 2006.
- NOBURY, C. J. & HICKSON, I. D. Cellular responses to Dna damage. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 41 p. 367-401. 2001.
- NYBERG, K. A.; MICHELSON, R. J.; PUTNAM, C. W.; WEINERT, T. A. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. **Annu. Rev. Genet.**, v. 36, p. 617-56, 2002.
- OISHI, I., IWAI, K., KAGOHASHI, Y., FUJIMOTO, H., KARIYA, K. Critical role of *Caenorhabditis elegans* homologs of Cds1 (Chk2)-related kinases in meiotic recombination. **Mol. Cell. Biol.** V. 21 p. 1329-1335, 2001.
- OSBORN, A. J.; ELLEDGE, S. J.; ZOU, L. Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. **Trends Cell Biol.**, v. 12, p. 509-516, 2002.
- OSHEROV, N., MATHEW, J., MAY, G. S. Polarity-defective mutants of *Aspergillus nidulans*. **Fungal Gent. Biol.** V. 31 p. 181-188, 2000.
- OSHEROV, N., MAY, G. S. Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis. **Genetics**, V. 155 p. 647-656, 2000.
- OSMANI, S. A., MAY, G. S., MORRIS, N. R. Regulation of the mRNA levels of *nimA*, a gene required for the G2-M transition in *Aspergillus nidulans*. **J. Cell Biol.** v. 104, p. 1495–1504, 1987.

OSMANI, S. A.; MIRABITO, P. M. The early impact of genetics on our understanding of cell cycle regulation in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 41, p. 401-410, 2004.

OSMANI, S. A.; YE, X. S. Cell cycle regulation in *Aspergillus nidulans* by two protein kinases. **Biochem. J.**, v. 317, p. 633-641, 1996.

OSMANI, S. A.; YE, X. S. Targets of checkpoints controlling mitosis: lessons from lower eukaryotes. **Trends Cell Biol.**, v. 7, p. 283-288, 1997.

PEREZ-HIDALGO, L., MORENO, S., SAN-SEGUNDO, P. A. Regulation of meiotic progression by the meiosis-specific checkpoint kinase Mek1 in fission yeast. **J. Cell Sci.** v. 116 p. 259-271, 2003.

PETRINI, J. H. The mammalian Mre11-Rad50-nbs1 protein complex: integration of functions in the cellular DNA-damage response. **Genet.** v. 64, p. 1264-9, 1999.

POULSEN, H. E. Oxidative DNA modifications. **Exp Toxicol Pathol** v. 57 Suppl 1:161-169, 2005.

PONTECORVO, G. ROPER, J. A., HEMMONS, L. M. MAC DONALD, K. D., BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Adv. Genet.**, v. 5, p. 141-238, 1953.

PREGUEIRO, A.M., LIU Q., BAKER, C. L., DUNLAP, J. C., LOROS, J. J. The *Neurospora* checkpoint kinase 2: a regulatory link between the circadian and cell cycles. **Science** v. 313 p. 644-649, 2006.

PRELICH, G. Suppression mechanisms: themes from variations. **Trends Genet.** v. 15, p. 261-266, 1999.

ROEDER, G. S., BAILIS, J. M. The pachytene checkpoint. **Trends Genet.** v. 16(9) p. 395-403, 2000.

R & D SYSTEMS. Cataloging electronic resources: R & D Systems. Disponível em: <http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR03_DNADamageResponse.aspx> Acesso em 15 de Outubro de 2007.

SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** V. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J., FRISCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.

SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L. A.; UNSAL-KAÇMAZ, K.; LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 73, p. 39-85, 2004.

SEKELSKY, J. J., BURTIS, K. C., HAWLEY, R. S. Damage control: the pleiotropy of DNA repair genes in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 148 p. 1587-1598, 1998.

SEMIGHINI, S. P.; KRESS-FAGUNDES, M. R. V. Z.; FERREIRA, J. C.; PASCON, R. C.; GOLDMAN, M. H. S.; GOLDMAN, G. H. Different roles of the Mre11 complex in the DNA damage response in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Microbiol.**, v. 48, p. 1693-1709, 2003.

SEMIGHINI, C. P., MARINS, M., GOLDMAN, M. H. S. GOLDMAN, G. H. Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter *Atr* genes in *Aspergillus nidulans* by Real-Time Reverse Transcription-PCR assay. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 68, p. 1351-1357, 2002.

SENGA, T., SIVAPRASAD, U., ZHU, W., PARK, J. H., ARIAS, E. E., WALTER, J. C., DUTTA, A. PCNA is a cofactor for Cdt1 degradation by CUL4/DDB1-mediated N-terminal ubiquitination. **J. Biol. Chem.** v. 281, p. 6246-6252, 2006.

SHACKELFORD, R. E., KAUFMANN, W. K., PAULES, R. S. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. **Free Radical Biology & Medicine**, V. 28, p. 1387-1404, 2000.

SHACKELFORD, R. E., INNES, C. L., SIEBER, S. O., HEINLOTH, A. N., LEADON, S. A., PAULES, R. L. The *Ataxia telangiectasia* Gene Product Is Required for Oxidative Stress-induced G1 and G2 Checkpoint Function in Human Fibroblasts. **J. Biolog. Chemistry**. V. 276 p. 21951-21959, 2001.

SHILOH, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, p. 155-168, 2003.

SHIMADA, M., NABESHIMA, K., TOUGAN, T., NOJIMA, H. The meiotic recombination checkpoint is regulated by checkpoint rad genes in fission yeast. **EMBO J.** v. 21 p. 2807-2818, 2002.

SHIMANOUCHI, K., TAKATA, K., YAMAGUCHI, M., MURAKAMI, S., ISHIKAWA, G., TAKEUCHI, R., KANAI, Y., RUIKE, T., NAKAMURA, R., ABE, Y., SAKAGUCHI, K. *Drosophila* damaged DNA binding protein 1 contributes to genome stability in somatic cells. **J. Biochem.** 139: 51-58, 2006.

SIA, E. A.; KIRKPATRICK, D. T. The yeast MSH1 gene is not involved in DNA repair or recombination during meiosis. **DNA Repair**, v. 4, p. 253-261, 2005.

SONODA, E., TAKATA, M., YAMASHITA, Y. M., MORRISON, C., TAKEDA, S. Homologous DNA recombination in vertebrate cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.** V. 98, 8388, 2001.

SUGASAWA, K., OKUDA, Y., SAIJO, M., NISHI, R., MATSUDA, N., CHU, G., MORI, T., IWAI, S., TANAKA, K., TANAKA, K., HANAOKA, F. UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. **Cell** v. 121, p. 387-400, 2005.

SUGASAWA, K. UV-induced ubiquitylation of XPC complex, the UV-DDB-ubiquitin ligase complex, and DNA repair. **J. Mol. Hist.** V. 37, p. 189-202, 2006.

TAKAO, M., ABRAMIC, M., MOOS, M. J. R., OTRIN, V. R., WOOTTON, J. C., MCLENIGAN, M., LEVINE, A. S., PROTIC, M. A 127 kDa component of a UV-damaged DNA-binding complex, which is

defective is some xeroderma pigmentosum group E patients, is homologous to a slime mold protein. **Nucleic Acids Res.** v. 21, p. 4111-4118, 1993.

TAKATA, K., YOSHIDA, H., YAMAGUCHI, M., SAKAGUCHI, K. Drosophila Damaged DNA-Binding Protein 1 Is an Essential Factor for Development. **Genetics** v. 168, p. 855–865, 2004.

THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D. G. THE ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.** v. 24, p. 4876-4882. 1997.

TIMBERLAKE, W. E. Molecular genetics of *Aspergillus* development. **Annu. Rev. Genet.**, v.24, p.5-36, 1990.

TORNALETTI, S., HANAWALT, P. C. Effect of DNA lesions on transcription elongation. **Biochimie** v. 81 p. 139-146. 1999.

TUDEK, B., SWOBODA, M., KOWALCZYK, P., OLINSKI, R. Modulation of oxidative dna damage repair by the diet, inflammation and neoplastic transformation. **J. Physiol. Pharmac.** v. 57 p. 33-49 2006.

VAN HEEMST, D., SWART, K., HOLUB, E. F., VAN DIJK, R., OFFENBERG, H. H., GOOSEN, T., VAN DEN BROEK, H. W., HEYTING, C. Cloning, sequencing, disruption and phenotypic analysis of *uvsC*, an *Aspergillus nidulans* homologue of yeast *RAD51*. **Mol Gen Genet.** V. 254 p. 654-64, 1997.

VIDANES, G. M., BONILLA, C. Y., TOCZYNSKI, D. P. Complicated tails: histone modification and the DNA damage response. **Cell** v. 121, p. 973-976, 2005.

WANG, X.Q., REDPATH, J. L., FAN, S. T., STANBRIDGE, E. J. ATR dependent activation of Chk2. **J. Cell Physiol.** V. 208 p. 613-619, 2006.

YANG, L.; UKIL, L.; OSMANI, A.; NAHM, F.; DAVIES, J.; DE SOUZA, C. P. C.; DOU, A.; PEREZ-BALAGUER, A.; OSMANI, S. A. Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. **Eukariotic Cell**, v. 3, p. 1359-1362, 2004.

YARNOLD, J. Molecular aspects of cellular responses to radiotherapy. **Radiotherapy and Oncology**, v. 44, p. 1-7, 1997.

YE, X. S., FINCHER, R. R., TANG, A., O' DONNELL, K., OSMANI, S. A. Two S-phase checkpoint systems, one involving the function of both BIME and Try15 phosphorylation of p34^{cdc2}, inhibit NIMA and prevent premature mitosis. **EMBO J.**, v. 15 P. 3599-3610, 1996.

YE, X. S., FINCHER, R. R., TANG, A., OSMANI, S. A. The G2/M DNA damage checkpoint inhibits mitosis through Try15 phosphorylation of p34 in *Aspergillus nidulans*. **EMBO J.**, v. 16 P. 182-192, 1997.

YINHUI, C., SANCHEZ, Y. Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. **DNA Repair** v. 3 p. 1025-1032, 2004.

YOKOI, M., MASUTANI, C., MAEKAWA, T., SUGASAWA, K., OHKUMA, Y., HANAOKA, F. The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIH to damaged DNA. **J Biol Chem** v. 275 p. 9870-9875. 2000.

YOON, J. H., LEE, B. J., KANG, H. S. The *Aspergillus nidulans* *uvsH* gene encodes a homolog to yeast *Rad18* and *Neurospora uvs2*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 248 p. 174-181, 1995.

ZHAO, H., PIWNICA-WORMS, H. ATR-Mediated Checkpoint Pathways Regulate Phosphorylation and Activation of Human Chk1. **Mol Cell Biol**. v. 21(13) P. 4129-4139, 2001.

ZHOU, H. X., WANG, G. Predicted structures of two proteins involved in human diseases. **Cell Biochem. Biophys**. v. 35, p. 35-47, 2001.

ZHOU, B. B., ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**, v. 408, p. 433-439, 2000.

ZOLEZZI, F., FUSS, J., UZAWA, S., LINN, S. Characterization of a *Schizosaccharomyces pombe* strain deleted for a sequence homologue of the human damaged DNA binding 1 (DDB1) gene. **J Biol Chem** v. 277, p. 41183-41191, 2002.

ZOLEZZI, F., LINN, S. Studies of the murine DDB1 and DDB2 genes. **Gene** v. 245, p. 151-159, 2000.