



**Función del gen *RAD17* en la reparación del  
ADN y en el control del ciclo celular en  
*Saccharomyces cerevisiae***

**Tesina de Grado  
Licenciatura en Bioquímica**

**Ana Gabriela Sánchez Reolon  
C.I.: 3.183.991-5**

**Tutor Responsable: Elia Nunes  
Lab. de Radiobiología - Dpto. de Biofísica  
Fac. de Medicina  
Unidad Asociada a Fac. de Ciencias  
UdelaR**

**Mayo 2013**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar agradezco a mis padres, Ana Gloria y Luis, porque me enseñaron que acunar un sueño y no bajar los brazos son indispensables en la vida. Fueron un apoyo constante y tanto Luis desde el cielo como Gloria que está a mi lado me forjaron a dar siempre un paso más, a buscar nuevas metas por alcanzar.

Agradezco también a Elia Nunes, mi tutora, porque me dio la oportunidad de descubrir y participar en el mundo de la Radiobiología. Su pensamiento crítico en el trabajo fue y es una enseñanza fundamental para mi crecimiento y desarrollo.

También estuvieron presentes en este camino mi amiga Lourdes y los compañeros Carmen y Nelson, a quienes les agradezco los aportes, todas las instancias de discusión, formales o informales y sobre todo la paciencia para lidiar conmigo. No me olvido de los demás compañeros del laboratorio y del Departamento de Biofísica, que también fueron parte de esto.

Y en especial quiero dar las gracias a tres personas que supieron saber motivarme a darle un fin a esta etapa, gracias Verónica, Cecilia y Pablo, porque cada uno a su manera (consciente o inconsciente) hizo que dentro de mí algo se moviera y pusiera manos a la obra.

# ÍNDICE TEMÁTICO

RESUMEN.....	5
I. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Control y Regulación del Ciclo Celular.....	7
1.2. Características Generales de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	10
1.3. Daño Genómico y Reparación del ADN.....	12
1.3.1. Reparación Recombinacional.....	14
1.3.1.1. Recombinación Homóloga.....	15
1.3.1.2. Recombinación No Homóloga.....	17
1.3.2. Reparación Escisional.....	18
1.3.2.1. Reparación por Escisión de Nucleótido.....	18
1.3.2.2. Reparación por Escisión de Base.....	19
1.3.2.3. Reparación de Bases Mal Apareadas.....	19
1.3.3. Epigenética y Reparación del ADN.....	20
1.4. <i>RAD17</i> : una Proteína Sensora del Daño en el ADN.....	20
1.5. Bleomicina: Antibiótico Antitumoral.....	22
1.5.1. Estructura de la Bleomicina.....	23
1.5.2. Proceso de Activación de la Bleomicina.....	24
1.5.3. Transporte de la Bleomicina.....	28
1.6. Cicloheximida: Inhibidor de la Síntesis Proteica.....	29
1.7. Hipótesis de Trabajo.....	30
1.8. Objetivos.....	30
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
2.1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	31
2.2. Medios de Cultivo.....	32
2.3. Agentes Químicos.....	32
2.4. Mantenimiento de las Cepas de <i>S. cerevisiae</i> .....	32
2.5. Condiciones de Crecimiento.....	32
2.6. Tratamiento con Bleomicina (BLM).....	33

2.7. Análisis de Sobrevida.....	33
2.8. Cinética de Proliferación en Medio Sólido.....	34
2.9. Determinación de la Reparación de Roturas Dobles del ADN.....	34
2.10. Determinación de las DSBs del ADN.....	35
2.11. Electroforesis por Campos Pulsados Transversos Alternados (TAFE)....	35
2.11.1. Aislamiento del ADN en Bloques de Agarosa.....	36
2.11.2. Condiciones de la Corrida Electroforética.....	39
2.11.3. Tinción del Gel.....	39
2.11.4. Fotografiado del Gel.....	39
III. RESULTADOS.....	40
3.1. Análisis de Sobrevida Bajo Tratamiento con Bleomicina.....	40
3.2. Estudio de la Cinética de Proliferación .....	41
3.3. Determinación de las Dobles Roturas de Cadena y su Reparación.....	44
IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	50
V. BIBLIOGRAFÍA.....	54

## **RESUMEN**

A nivel celular se emplean diversos mecanismos de vigilancia en orden de garantizar la progresión ordenada y correcta de eventos del ciclo celular, como la replicación del material genético y la segregación cromosómica. Para lograr este objetivo las células se valen de puntos de control, los cuales se han mantenido a lo largo de la evolución. Al producirse daño sobre el ADN, estos puntos de control desencadenan señales, tales como el freno en el ciclo celular que proporciona tiempo suficiente para que los mecanismos de reparación genómica se pongan en juego. El complejo *RAD24* (*RAD24*, *RAD17*, *DDC1* y *MEC3*) comprende a la lanzadera específica de daño del ADN conocida como el complejo Rad9-Hus1-Rad1 en humanos y *S. pombe* y Ddc1-Mec3-Rad17 en *S. cerevisiae*, el cual está involucrado en la regulación de los puntos de control.

La hipótesis del presente trabajo propone que la proteína de control del ciclo celular y sensora de daño Rad17 de *Saccharomyces cerevisiae* también se encuentra involucrada en funciones de reparación del ADN. Para demostrar esta hipótesis y de acuerdo a los objetivos planteados se utilizaron poblaciones diploides en fase exponencial del mutante *rad17Δ/rad17Δ* y su salvaje isogénica expuestas al radiomimético bleomicina (BLM). Se midieron las fracciones sobrevivientes, la cinética de proliferación y las dobles roturas de hebra de ADN (DSBs), estas últimas determinadas por electroforesis en campos pulsados. Las determinaciones se realizaron inmediatamente luego del tratamiento o luego de la incubación en medio nutriente en presencia o ausencia de cicloheximida (CHX). La cepa salvaje presentó una disminución significativa de las DSBs producidas por la BLM bajo incubación en medio líquido, inhibiéndose la recuperación cromosómica con CHX. Las células *rad17Δ/rad17Δ* expuestas a bajas concentraciones de BLM no mostraron reparación de DSBs, baja tasa de supervivencia y la CHX no produjo efecto alguno. En cambio, a altas concentraciones de BLM la población mutante mostró reparación de DSBs e inhibición de la reparación de DSBs por CHX. Los presentes resultados indican de acuerdo a hipótesis, que Rad17 es esencial

para la inducción de la reparación de DSBs luego de la exposición a bajas concentraciones del radiomimético BLM.

En conclusión, las observaciones en el presente trabajo y los hallazgos recabados por otros autores, indican a Rad17 como parte de una vía con la presencia de conmutadores moleculares que, dependiendo de la magnitud del daño, permiten canalizar las señales a diversos caminos alternativos de reparación de ADN. \*)

\*) Parte de los resultados del presente trabajo de graduación han sido publicados en: *Radiat Environ Biophys* (2007). (Bracesco et al., 2007). Ver Bibliografía.

# I. INTRODUCCIÓN

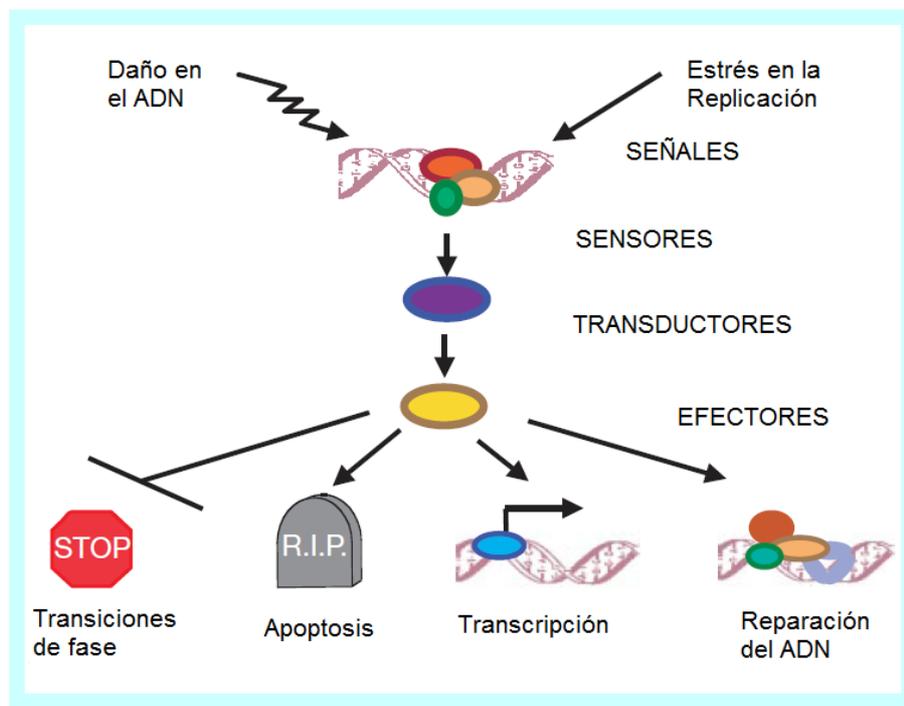
## 1.1. Control y Regulación del Ciclo Celular

Las células eucariotas emplean diversos mecanismos de vigilancia que ayudan a garantizar la progresión ordenada y la finalización de eventos críticos como la replicación cromosómica y la segregación durante la división celular. (Ciccia and Elledge, 2010; Kondo et al., 1999). Los puntos de transición que son sensibles a controles de retroalimentación han sido llamados puntos de control (checkpoints, en inglés). Estos puntos de control garantizan la estructura correcta de los eventos del ciclo celular, siendo vías de regulación que controlan el orden y el tiempo de las transiciones asegurando que los eventos críticos como la replicación del ADN y la segregación cromosómica sean completados con alta fidelidad. La mayoría de las proteínas de control de daño en el ADN se han conservado y la organización general de las vías ha sido mantenida a lo largo de la evolución. Teóricamente, las vías requieren sólo tres componentes: un sensor de daño, un transductor de señal y un efector. El daño en el ADN desencadena la respuesta de los puntos de control en varias etapas del ciclo celular. Ha sido ampliamente sugerido que el freno por los puntos de control proporciona mayor tiempo para los eventos de reparación del ADN. Así, uno puede anticipar que un mutante que tiene un defecto en el freno del ciclo celular inducido por daño se manifestará modificando su sensibilidad a la muerte por uno o más agentes que dañan el ADN. De hecho, mutantes defectivas en el control de estos puntos de control han sido detectadas entre una colección extensa de mutantes radio-sensibles aisladas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*. (Hartwell and Weinert, 1989; McGowan and Russell, 2004; Murray, 1992; Siede, 1995; Siede et al., 1996).

La pérdida de los puntos de control resulta en inestabilidad genómica y ha sido implicada en la evolución de células normales a células cancerígenas. (Elledge, 1996). El análisis de eucariotas inferiores como *Saccharomyces cerevisiae*, ha provisto del entendimiento de las cascadas de transducción de señales que

resultan en la detención del ciclo celular en respuesta al daño en el ADN (Hartwell and Weinert, 1989; Nyberg et al., 2002).

Avances recientes han revelado vías de transducción de señales que transmiten las señales de los puntos de control en respuesta al daño en el ADN, bloqueos de replicación, y daños en el huso. Las respuestas de los puntos de control no sólo incluyen frenos en varios estadios del ciclo celular, sino también aumento de la reparación por regulación transcripcional, relocalización y modificaciones covalentes de proteínas de reparación. (Bashkirov et al., 2000; Mills et al., 1999; Wan et al., 2011).



**Figura 1:** Esquema general de la vía de transducción de señal en respuesta al daño en el ADN. Las flechas con extremos en punta representan los eventos activados y aquellas con extremos perpendiculares representan eventos inhibitorios. Con el propósito de simplicidad, la red de interacción de vías se representa como una vía lineal que consiste en señales, sensores, transductores y efectores; aunque bien es sabido que las fases del ciclo contribuyen en la toma de decisiones en los puntos nodales que provocan

como resultado la activación diferencial de vías efectoras. (Extraído y modificado de (Zhou and Elledge, 2000)).

En *S. cerevisiae* las vías de control inducen un freno en el ciclo celular en las transiciones G1/S o G2/M y retardan la progresión de la fase S en respuesta al daño. Otros puntos de control evitan que aquellas células que tienen su ADN replicado de forma incompleta abandonen la fase S. Los genes *RAD9*, *RAD17*, *RAD24*, *MEC3* y *DDC1* están involucrados no sólo en la transición G2/M sino también en los puntos de control de las fases G1 y S. (Kondo et al., 1999).

Se ha reportado que Mec3, Rad17 y Rad24 pertenecen al mismo grupo epistático. Mediante el empleo de un ensayo que mide el procesamiento del daño en el ADN “*in vivo*”, se mostró que los genes de control *RAD17*, *RAD24* y *MEC3* activan una exonucleasa que degrada el ADN. La degradación probablemente sea una consecuencia directa de la función de una proteína de control, ya que *RAD17* codifica para una exonucleasa 3'-5' putativa. (Lydall and Weinert, 1995). Estas observaciones han sugerido que Mec3, Rad17 y Rad24 probablemente funcionen promoviendo el procesamiento de roturas simples del ADN y que Rad9 quizás inhiba su degradación. (Kondo et al., 1999). Ambas ramas, *RAD9* y *RAD24* convergen en *MEC1*, un miembro de la familia fosfoinositol 3-quinasa (IP3-, del inglés) (Baldo et al., 2012; Friedberg et al., 1995). Dentro de la fase S, existen una o más vías independientes que censan el daño en el ADN. Las vías específicas de la fase S que censan también se cree que convergen en *MEC1*. Los genes *MEC1*, *RAD53* y *CHK1* codifican como transductores de la señal de control. (Lowndes and Murguía, 2000).

Dos complejos distintos se localizan independientemente respecto a sitios de daño en el ADN en *Saccharomyces cerevisiae*, pero la presencia de ambos complejos es requerida para la apropiada función de los puntos de control. La proteína quinasa Mec1 forma un complejo con Ddc2 y funciona tanto en el reconocimiento del daño en el ADN así como en la transducción de la señal. Otro conjunto de proteínas, Rad17, Mec3 y Ddc1, conforman la lanzadera de

punto de control heterotrimérica, la cual es un factor de respuesta temprano al daño en el ADN en una vía de transducción de señales llevando a la activación de los sistemas de control y eventualmente al freno del ciclo celular. Estas proteínas presentan estructuras similares con la abrazadera de replicación, el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) y de hecho, se demostró “*in vitro*” que el complejo Rad17/Mec3/Ddc1 podría ser cargado al ADN por cargadores de abrazaderas específicas de los puntos de control como Rad24-RFC (RFC, factor C de replicación). Estos complejos de proteínas funcionan primariamente en el reconocimiento y procesamiento del daño en el ADN, muestran secuencias similares al del factor C de replicación (RFC, del inglés) y del antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA, del inglés), el sistema eucariota de carga de lanzadera que es central en la estructura de la horquilla de replicación. (Kai, 2013; Majka and Burgers, 2003; Majka and Burgers, 2005; Melo et al., 2001).

El grupo epistático *RAD24* (RAD24, RAD17, DDC1 y MEC3) comprende a la lanzadera específica de daño del ADN conocida como el complejo Rad9-Hus1-Rd1 en humanos y *S. pombe* y Ddc1-Mec3-Rad17 en *S. cerevisiae*, el cual está involucrado en la regulación de los puntos de control de daño en el ADN. Esta lanzadera es cargada en los sitios de daño por el complejo de replicación factor C (RFC) alternativo, donde una subunidad, la Rfc1, es reemplazada por la subunidad Rad24 específica de punto de control. Las funciones putativas del complejo 9-1-1 involucran la activación de la actividad quinasa ATR/Mec1 y el reclutamiento de otros factores que podrían propagar la vía de respuesta de los puntos de control o facilitar la procesividad de la horquilla de replicación. (Murakami-Sekimata et al., 2010).

## **1.2. Características Generales de *Saccharomyces cerevisiae***

Los eucariotas unicelulares ofrecen muchas ventajas como modelos de investigación porque tienen genomas relativamente pequeños en comparación con otros eucariotas, una cantidad también menor de genes con disponibilidad

de los respectivos mutantes y facilidades en el cultivo. Las levaduras son microorganismos que pertenecen al reino Fungi, división Ascomycetes y a la clase Hemiascomycetes (Walker, 1998; Watson, 2006).

Actualmente, las especies más utilizadas en la investigación básica y en la industria son *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de gemación) y *Schizosaccharomyces pombe* (levadura de fisión). Estas levaduras pueden proliferar con rapidez en el laboratorio (una división celular se alcanza aproximadamente a los 90 minutos en condiciones óptimas), y permitir la propagación de las poblaciones clonadas a partir de una sola célula precursora. Más allá de su simplicidad, las células de levadura tienen las características fundamentales de las células eucariotas, presentando una característica peculiar que es la de poseer una mitosis cerrada, sin fragmentación de la membrana nuclear.

En *S. cerevisiae* el brote se inicia en la transición G1/S y se separará de su madre al terminar la mitosis. La existencia del brote es una señal de que la célula ha pasado el inicio o “start” hacia S y su tamaño indica el progreso dentro del ciclo. (Alberts and Bray, 2006). La relación característica entre el tamaño del brote y los eventos bioquímicos en las distintas fases, permite el seguimiento aproximado del ciclo celular en medio sólido, lo cual es muy útil para estudios de retardos en ciclos sucesivos de división. (Nunes et al., 1975).

Aunque están en la misma rama del árbol filogenético, las dos especies mencionadas están distantemente relacionadas, habiendo divergido evolutivamente hace varios cientos de millones de años. A pesar de ello, ambos microorganismos tienen ciclos celulares parecidos. Ambas proliferan tanto en estado diploide como haploide, mientras que las células diploides pueden experimentar meiosis formando productos haploides del tipo  $a$  y  $\alpha$  y a su vez éstos pueden conjugarse entre sí restaurando el estadio diploide (Herskowitz, 1988). Estos dos alelos salvajes del locus, relacionados con el tipo de apareamiento o “mating-type” son designados como *MAT a* y *MAT  $\alpha$* . (Hartwell, 1974; Morgan, 2007).

Las levaduras son de fácil mantenimiento y multiplicación en laboratorio, utilizándose para tal efecto, sistemas de cultivos cerrados o abiertos. En cultivos cerrados, las levaduras presentan una cinética de crecimiento diáuxico que consiste en fermentar o metabolizar glicolíticamente la glucosa durante la primera fase de crecimiento produciendo etanol, cambiando luego al metabolismo oxidativo. De esta forma, las poblaciones celulares de levaduras crecen en medio nutriente, con glucosa y nitrógeno, observándose varias fases de crecimiento secuenciales denominada fase lag o de latencia, fase logarítmica, cambio diáuxico, fase post-diáuxica, fase estacionaria y fase de declinación. Durante la fase lag ocurre la adaptación de la célula al medio, lo cual implica el ajuste de su metabolismo para el aumento de su masa celular, pero su número permanece constante. La glucosa es un nutriente limitante del crecimiento y al consumirse se activa el metabolismo oxidativo (cambio diáuxico). En la fase post-diáuxica, el crecimiento poblacional continúa utilizando la energía proveniente de la respiración. La fase estacionaria de crecimiento de un microorganismo se caracteriza por la ausencia del incremento neto en el número de células y fisiológicamente como la capacidad de mantener la viabilidad en un contexto de limitación de los nutrientes del medio de cultivo. En la fase de declinación el número de sobrevivientes disminuye con el tiempo en proporción geométrica. (Madigan et al., 2003).

La levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* ha sido ampliamente usada como modelo biológico para estudiar la reparación del ADN. La fuerza de la levadura como modelo se basa en la facilidad de su manipulación genética y el alto grado de homología entre los genes de humanos y levadura. (Foury, 1997).

### **1.3. Daño Genómico y Reparación del ADN**

La reparación del daño al material genético es crucial para los organismos vivos ya que están siendo expuestos continuamente a agentes endógenos y ambientales, de naturaleza física, química y biológica, que dañan el ADN. Por

ejemplo en los eucariotas superiores, la deficiencia en la reparación de daño en el ADN puede conducir a transformación maligna por acumulación de mutaciones, o a ciertas enfermedades degenerativas. (Friedberg et al., 1995). Las células eucariotas responden al daño en el ADN enlenteciendo la progresión del ciclo celular y a su vez reparando los distintos tipos de lesiones con distintos conjuntos de proteínas. Como se mencionó anteriormente, a esta detención del ciclo celular se le llama punto de control de daño en el ADN y puede llevar a un retraso irreversible del ciclo celular o permitir un tiempo celular para reparar el daño en el ADN antes de que se replique o tenga lugar la segregación mitótica. La evidencia disponible indica que complejos proteicos especializados censan el daño en el ADN y desencadenan señales inhibitorias que afectan la maquinaria del ciclo celular. Varios de los genes de estas proteínas han sido identificados en las levaduras de fisión y gemación a través de mutaciones que causan defectos en los puntos de control del ADN e hipersensibilidad a agentes que dañan el ADN. La conservación de algunos de estos genes en levaduras lejanamente divergentes indica que los mecanismos de control de daño en el ADN han sido altamente conservados a través de la evolución. (Elledge, 1996; Freire et al., 1998; Paulovich et al., 1997).

Sin embargo, los detalles de la organización e interacciones entre las proteínas involucradas en estas respuestas permanecen en parte desconocidas. Específicamente, poco se sabe sobre los roles de estas proteínas en presencia de diferentes niveles de daño en el ADN y durante distintas condiciones de crecimiento. Las dobles roturas de cadena (DSBs) pueden activar los puntos de control en diferentes etapas del ciclo celular; y en presencia de daño extenso o en ausencia de reparación, estas vías quizás también pueden desencadenar la muerte celular programada o apoptosis. (Lowndes and Murguia, 2000; Nyberg et al., 2002). La interconexión entre sensores de daño y los efectores de la reparación del ADN en células que estén continuamente ciclando y en aquellas que no, sea bajo exposición a agentes genotóxicos o durante el metabolismo normal, es asunto de actuales investigaciones. (Bracesco et al., 2007; Polo and Jackson, 2011; Shin et al., 2004).

Las lesiones producidas en el ADN por agentes físicos y químicos pueden repararse con cierta probabilidad dependiendo de factores genéticos, metabólicos y ambientales, restaurando la continuidad y función del genoma. Los sistemas de reparación involucran enzimas que se encuentran presentes en organismos tales como virus hasta mamíferos, e incluso en células tumorales. (Ronen and Glickman, 2001). La probabilidad de error en la reparación es uno de los mecanismos más importantes de la mutagénesis. Las mutaciones son materia prima de la evolución de las especies y base de la biodiversidad.

La reparación exacta del daño en el ADN es de suma importancia para la integridad del genoma. En respuesta al daño, las redes entrelazadas de los mecanismos de vigilancia actúan para detener temporalmente la progresión del ciclo celular y promover la reparación del ADN. La regulación de la reparación del ADN es generalmente dependiente, o tiene en cuenta, dos factores diferentes: el tipo de lesión en el ADN que necesita ser reparado y las características del sustrato relacionado al ciclo celular. Éstas características incluyen la expresión o la estabilidad de ciertas proteínas de reparación, el nivel de compactación de la cromatina y la disponibilidad de las cromátidas hermanas. (Branzei and Foiani, 2008).

### *1.3.1. Reparación Recombinacional*

La rotura de doble hebra (DSBs) del ADN es la principal lesión citotóxica de la radiación ionizante y de los químicos radiomiméticos, pero también puede ser causada por estrés mecánico en los cromosomas cuando una ADN polimerasa replicativa encuentra una rotura de simple hebra en el ADN u otro tipo de lesión. Las DSBs también pueden ocurrir como intermediarios en varios eventos biológicos, como la recombinación V(D)J en el sistema inmunitario (ej.: desarrollo de los linfocitos). La reparación inexacta o la falta de reparación de las DSB puede conducir a mutaciones o a una inestabilidad genómica a gran escala a través de la generación de fragmentos cromosómicos dicéntricos o

acéntricos. Tales cambios en los genomas presentan potencial carcinogénico. Debido a las amenazas planteadas por los DSBs, las células eucariotas han desarrollado sistemas complejos y altamente conservados para detectar de forma rápida y eficiente estas lesiones, señalar su presencia y lograr su reparación. Por tanto, clasificaremos a los eventos de reparación en dos categorías principales. Los eventos de Recombinación Homóloga (RH) de varios tipos se caracterizan por la necesidad de la hebra dañada de emparejarse con su compañero homólogo, donde el grado de interacción generalmente involucra cientos de pares de bases que emparejan perfectamente. En contraste, los eventos de la reparación no homóloga (unión de extremos no homólogos, NHEJ, del inglés), pueden aparentemente unir los extremos de ADN sin complementariedad de bases en la unión, aunque en general resulta que la mayoría de estos eventos hacen uso de un número muy pequeño de pares de bases homólogas (microhomologías). En levaduras, los eventos de reparación no homóloga ocurren generalmente a una frecuencia significativamente más baja en comparación con los eventos homólogos y predominan en G1. (Jackson, 2002; Nunes et al., 2008; Paques and Haber, 1999).

#### 1.3.1.1. Recombinación Homóloga

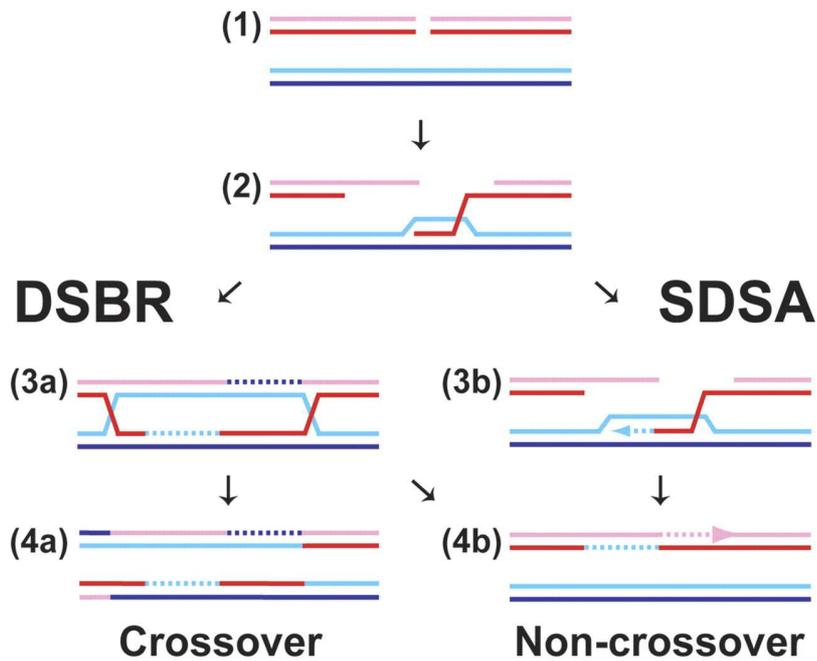
El mecanismo general es bien conocido e incluye el procesamiento de los extremos mediante una exonucleasa 5'→3' para dejar extensiones 3'-OH libres; esto se logra mediante la acción conjunta del complejo MRX (Mre11-Rad50-Xrs2), Sae2, la helicasa Sgs1 y las nucleasas Dna2 y/o Exo1. (Zhu et al., 2008). La invasión sobre la doble hebra homóloga por parte del filamento de ADN monocatenario está promovida por la proteína Rad52 y facilitada por Rad59. A continuación la proteína Rad51 con la ayuda de Rad55, Rad57 y Rad54 cataliza el intercambio de cadenas entre las dos moléculas implicadas lo que permite extender la cadena usando la hebra complementaria como molde, al tiempo que también se extiende el otro extremo que había quedado libre.

Tras una corta extensión, los extremos libres se unen por acción de una ligasa y esto genera dos estructuras en las que una hebra salta de una molécula de ADN a la molécula homóloga. Dichas estructuras se denominan uniones de Holliday y han de resolverse de algún modo para permitir la separación de las dos cromátidas. (Prado et al., 2003).

Las posibles resoluciones son:

- Asociación de cadenas dependientes de síntesis (SDSA, del inglés), donde el intercambio de cadenas se revierte y la cadena recién sintetizada vuelve a aparearse con la molécula desde la que se realizó la invasión generando conversión génica (Figura 2).
- Reparación de cortes de doble cadena (DSBR, del inglés), donde el intercambio de cadenas y la síntesis de ADN llegan hasta el segundo extremo del ADN procesado teniendo lugar la captura de éste formando dos uniones de Holliday. La resolución de estas uniones de Holliday origina conversión génica que puede estar asociada a entrecruzamiento (Figura 2). (Prado et al., 2003).

En células haploides de *Saccharomyces cerevisiae* la reparación recombinacional homóloga es un proceso post-replicativo, mientras que en las células diploides puede ser tanto pre como post-replicativo (Figura 2). (Bracesco et al., 2003).



**Figura 2:** Posibles resoluciones de la reparación de dobles roturas de cadena por Recombinación Homóloga (desarrolladas en el texto). (Imagen extraída de (Symington and Heyer, 2006)).

### 1.3.1.2. Recombinación No Homóloga

Los rearrreglos cromosómicos usualmente se suceden por recombinación ilegítima, la cual ocurre entre secuencias de ADN no homólogas o en regiones muy cortas de homología. (Tsukamoto et al., 1996). En *Saccharomyces cerevisiae* se observa que el mecanismo se inicia con la unión del complejo proteico hdf1-Ku80 a los extremos de la DSB protegiéndolos de la degradación. El complejo MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) interviene en el procesamiento y/o permite que los extremos de la rotura no se separen uno del otro. Finalmente la ligasa Dnl4 junto con sus cofactores Lif1 y Nej1 sellan la DSB. (Daley et al., 2005).

### 1.3.2. *Reparación Escisional*

Entre los mecanismos de reparación del ADN que operan en respuesta a la presencia de daño en las bases del ADN, tres vías bioquímicas resultan en la escisión del daño o bases inapropiadas. Estos son llamados Reparación por Escisión de Bases (BER, "base excision repair"), Reparación de Bases Mal Apareadas (MMR, mismatch repair) y Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER, nucleotide excision repair).

#### 1.3.2.1. Reparación por Escisión de Nucleótidos

La reparación por escisión de nucleótidos es uno de los sistemas de reparación que son operacionales en la célula para asegurar el correcto funcionamiento y una transmisión fiel de la información genética. NER reconoce y elimina un amplio espectro de lesiones no relacionadas estructuralmente como los fotoproductos inducidos por la luz ultravioleta, aductos químicos voluminosos y algunos tipos de entrecruzamiento. En este tipo de reparación, luego del reconocimiento, el daño en el ADN es removido a través de una incisión en la cadena dañada a ambos lados de la lesión, seguido de reparación mediante la polimerasa, la cual llena el hueco usando la hebra intacta como molde, y finalmente se produce la ligación. En eucariotas, incluidos los humanos, el daño que se escinde comprende un fragmento de 24-32 nucleótidos de largo. La reparación escisional es un mecanismo de defensa muy importante contra dos carcinógenos principales: la radiación UV y el benzopireno. Individuos con defectos en la NER exhiben alta incidencia de cáncer. (Bootsma et al., 1995; Sancar, 1996). En humanos, muchos son los polipéptidos que se ponen en juego, entre ellos siete proteínas *Xeroderma pigmentosum* (XP) y proteínas de unión a simple hebra (HSSB). (Bootsma and Hoeijmakers, 1994; Nunes and Gelós, 2006). Las consecuencias dramáticas de una NER defectiva pueden observarse en las enfermedades humanas heredables *Xeroderma pigmentosum* y el Síndrome de Cockayne (CS). Dichas patologías son enfermedades hereditarias, autosómicas recesivas, asociadas con deficiencias

en distintas etapas de la reparación por escisión de nucleótidos. Los pacientes afectados son extremadamente fotosensibles y exhiben anomalías esqueléticas y neurológicas; los pacientes XP presentan además alta frecuencia de cáncer de piel (excepto melanoma). Los productos génicos afectados en CS son componentes de una sub-vía especial de NER conocida como reparación acoplada a la transcripción (TCR). (de Boer and Hoeijmakers, 2000).

#### 1.3.2.2. Reparación por Escisión de Bases

La reparación por escisión de bases se inicia por una clase de enzimas específicas de reparación del ADN –ADN glicosilasa- donde cada una reconoce un único o pequeño conjunto de bases químicamente alteradas o inapropiadas. Seguidamente se genera un sitio abásicoapurínico o apirimidínico (AP). Este sitio será reconocido por endonucleasas que generarán extremos 3'-OH libres capaces de ser resintetizados formando un nuevo fragmento y ligados nuevamente al extremo libre. (Friedberg, 2001; Friedberg et al., 1995).

#### 1.3.2.3. Reparación de Bases Mal Apareadas

La reparación de bases mal apareadas es un proceso biológico dedicado primeramente a escindir nucleótidos que no están correctamente apareados con el nucleótido (correcto) en la hebra opuesta. Los apareamientos incorrectos que ocurren con mayor frecuencia (pero no exclusivamente) se suceden durante la replicación del ADN, dada la limitada fidelidad de la maquinaria replicativa del ADN. Así, se colocan bases incorrectas en la nueva hebra de ADN sintetizada, que pueden reconocerse antes de la metilación. En este tipo de reparación están implicados los productos génicos MutH, MutL y MutS; donde la proteína MutS reconoce el mal apareamiento, la MutH distingue ambas cadenas cortando en la región GATC y la proteína MutL coordina la actividad de las otras dos. (Friedberg, 2001; Friedberg et al., 1995).

### 1.3.3. *Epigenética y Reparación del ADN*

Así como en los procesos del metabolismo del ADN (transcripción y replicación), la detección, señalización y reparación de lesiones en el genoma también tiene lugar en el contexto de la cromatina altamente organizada. Por tanto, no es de extrañarse que la célula cuente con mecanismos para remodelar o modificar la estructura de la cromatina y que estos desempeñen una función esencial en la respuesta celular al daño en el ADN. (Downs et al., 2007; Lydall and Whitehall, 2005). En *S. cerevisiae* jerarquizaremos *RAD6* y las desacetilasas (*SIR*). En un trabajo pionero se demostró “*in vitro*” que el gen *RAD6(hUBC2)* codifica una enzima que cataliza la unión covalente de ubiquitinas a las proteínas histónicas H2A y H2B. (Jentsch et al., 1987). Por otra parte las desacetilasas se involucraron por primera vez en procesos de envejecimiento celular en *S. cerevisiae* y se sabe que el daño en el ADN desencadena la desacetilación de CtIP (proteína de unión al extremo C-terminal) dependiente de *SIRT6*, promoviendo la resección y la recombinación homóloga. (Kaidi et al., 2010).

### 1.4. **RAD17: una Proteína Sensora del Daño en el ADN**

El gen *RAD17* de *Saccharomyces cerevisiae* codifica para una proteína de 45.5 kDa con homología a las proteínas codificadas por otros organismos: Rec1 en *Ustilago maydis*, Rad1 en *S. pombe* y hRad1 en humanos; es un ejemplo de proteína de reconocimiento de daño conservada. Rad17p comparte similitudes estructurales con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, proliferating cell nuclear antigen), formando una estructura en anillo homotrimérica alrededor del ADN y comúnmente referida como “abrazadera deslizante” que amarra a las polimerasas de replicación a su molde. Rad17p forma un complejo estable con dos proteínas de control adicionales parecido al PCNA: Ddc1p y Mec3p. Los modelos moleculares sugieren efectivamente que la conformación de la abrazadera es Rad17/Mec3/Dcd1. Dicho conjunto de proteínas es un complejo proteico sensor de daño putativo esencial para

múltiples puntos de control que podría jugar un rol en la reparación del ADN. (Tabla 1) (Bracesco et al., 2007; Nyberg et al., 2002; Zhang et al., 2001).

<b>Function</b>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>S. pombe</i>
<i>Sensors</i>			
9-1-1 complex	Ddc1	hRad9	Rad9
	Mec3	hHus1	Hus1
	Rad17	hRad1	Rad1
RFC-like clamp loader	Rad24	hRad17	Rad17
	Rfc2-5	hRfc2-5	Rfc2-5
MRX complex	Mre11	hMre11	Mre11
	Rad50	hRad50	Rad50
	Xrs2	hNbs1	Nbs1
BRCT-containing	Dpb11	TopBP1	Cut5
		BRCA1	
		hMdc1	
ss-DNA binding	RPA	RPA	RPA
<i>Transducers</i>			
PI3K-like kinases	Mec1-Ddc2	ATR-ATRIP	Rad3-Rad26
	Tel1	ATM	Tel1
<i>Adaptors</i>			
	Rad9	53BP1	Crb2
	Mre1	CLSPN	Mre1
<i>Effectors</i>			
Checkpoint kinases	Chk1	CHK1	Chk1
	Rad53	CHK2	Cds1

**Tabla 1.** Factores relacionados con los puntos de control de daño en el ADN. (Extraída de (Baldo et al., 2012)).

Como se describe en la Tabla 1, Rad24p de *Saccharomyces cerevisiae* es otra proteína potencialmente sensora requerida para el freno del ciclo celular inducido por daño que probablemente interacciona con el complejo Rad17/Mec3/Ddc1. Rad24p forma un complejo estable con cuatro de cinco subunidades del factor C de replicación (Rfc2p-Rfc5p), llamado Rad24-RFCs. (Majka and Burgers, 2003; Zhang et al., 2001).

Estudios previos evidencian que el cargador de la lanzadera RFC-Rad24 interactúa con la lanzadera Rad17/Mec3/Ddc1 de manera ATP dependiente y que carga a la lanzadera en el ADN parcialmente dúplex. Es más, tras la hidrólisis de ATP, la lanzadera Rad17/Mec3/Ddc1 se libera del cargador de lanzadera y puede deslizarse sobre el ADN dúplex por más de 1kb, proceso que puede ser muy adecuado para la búsqueda de daños. (Majka and Burgers, 2003).

Estudios bioquímicos de sistemas de control del daño en el ADN evidenciaron que el sistema cargador de lanzadera-lanzadera está involucrado en la respuesta de control. Aunque además de la lanzadera principalmente encontrada del heterotrímero Rad17/Mec3/Ddc1, también se identificó un complejo que consistía de Rad17 y Mec3, quizás en forma Rad17/Rad17Mec3 trimérica. La posibilidad de lanzaderas de control alternativas puede proporcionar diversidad de respuestas y están en concordancia con un estudio que identifica la interacción Rad17-Rad17 en respuesta al daño. Por último, la interacción consigo mismo quizás simplemente aumente debido a que los monómeros de Rad17p se acercan entre sí en el contexto de ADN dañado. (Majka and Burgers, 2003; Zhang et al., 2001).

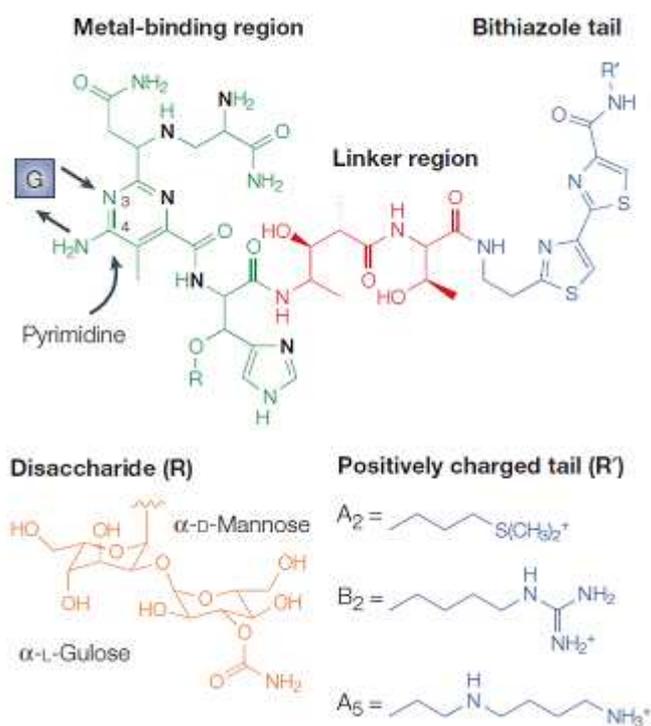
### **1.5. Bleomicina: un Antibiótico Antitumoral**

Las bleomicinas (BLM) son una familia de antibióticos glicopeptídicos aislados por Umezawa y colegas en la década de los 60s del organismo *Streptomyces verticillus*. (Umezawa et al., 1966). Estos organismos producen varias especies de BLM como BLM-A1 a A6 y BLM-B1 a B6 que difieren entre ellas en la fracción de unión al ADN. (Aouida et al., 2010). Presentan actividad antitumoral y han sido usadas clínicamente en combinación quimioterapéuticas contra linfomas, carcinomas de células escamosas y tumores de células germinales. Los efectos secundarios de las bleomicinas son dependientes de la dosis e involucran inflamación de los pulmones que a menudo derivan en fibrosis pulmonar. (Chen and Stubbe, 2005).

### 1.5.1. Estructura de la Bleomicina

Los miembros de la familia de las bleomicinas comparten la misma estructura nuclear pero difieren en sus cadenas laterales (R) que pueden presentar distintos grupos funcionales con colas conteniendo azúcares y cargas positivas. La BLM está compuesta de tres dominios funcionales, el dominio N-terminal de unión al metal, el dominio C-terminal de unión al ADN y la fracción de carbohidrato (Figura 3). (Ramotar and Wang, 2003; Umezawa, 1976).

El estudio de un gran número de bleomicinas análogas, llevado a cabo por la síntesis total de bleomicina, indicó que la molécula en su conjunto es mucho más que la suma de sus partes. La región de unión (en rojo, Figura 3) entre el dominio de unión al metal y el dominio de unión al ADN (bitiazoles, en azul, Figura 3) y la flexibilidad de la fracción del bitiazol en sí mismo son esenciales para la eficiente rotura de doble hebra.

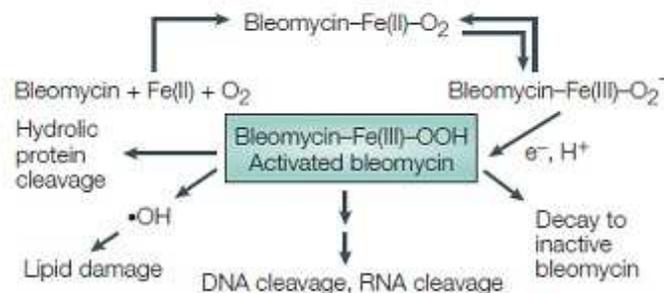


**Figura 3:** Estructura química de la bleomicina exhibiendo sus tres dominios funcionales. (Imagen extraída de (Chen and Stubbe, 2005)).

El dominio N-terminal además de unirse al surco menor del ADN, también une oxígeno molecular, y es en gran parte el responsable de la actividad antitumoral de la bleomicina. Éste dominio presenta ligandos (átomos de nitrógeno) involucrados en la formación de un complejo octaédrico con metales de transición, el cual le proporciona ductilidad a la hora del requerimiento de metales, de ésta forma, es capaz de unir iones metálicos tanto redox como hierro y cobalto. El metal de transición es necesario para facilitar el contacto entre la BLM y el ADN y para activar el oxígeno de forma que las especies radicales sean generadas. El dominio C-terminal, que abarca el grupo bitiazol, presenta colas cargadas positivamente que intensifican la unión electrostática de la bleomicina al ADN. La unión puede ocurrir por intercalación o a través de interacciones con el surco menor. (Ramotar and Wang, 2003).

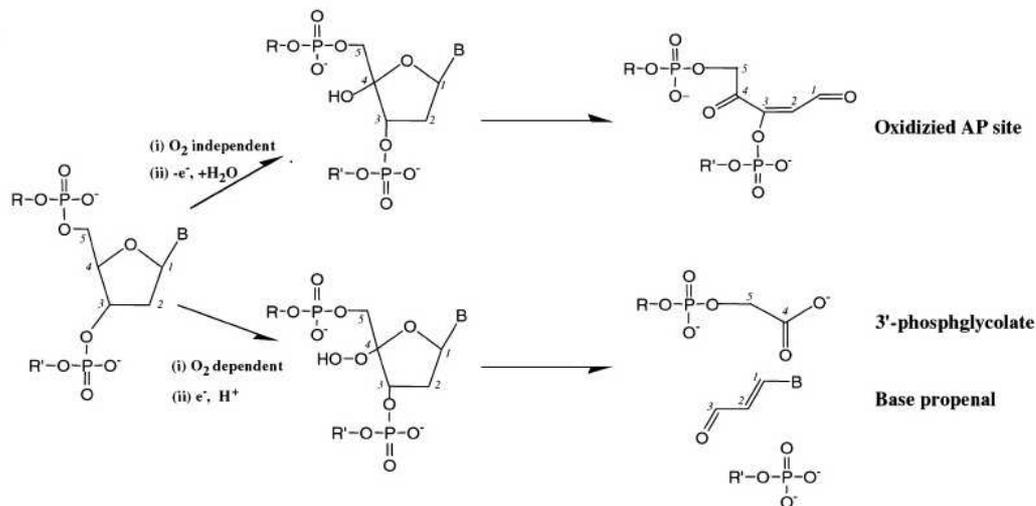
#### 1.5.2. Proceso de Activación de la Bleomicina

La BLM puede causar un grupo limitado de lesiones en el ADN a través de procesos conducidos por radicales libres. Primeramente, la BLM requiere de un metal de transición reducido (Fe(II) o Cu(II)), oxígeno y un electrón reductor para generar una bleomicina “activada”. (Figura 4).



**Figura 4:** Formación de bleomicina “activada”. (Imagen extraída de (Chen and Stubbe, 2005)).

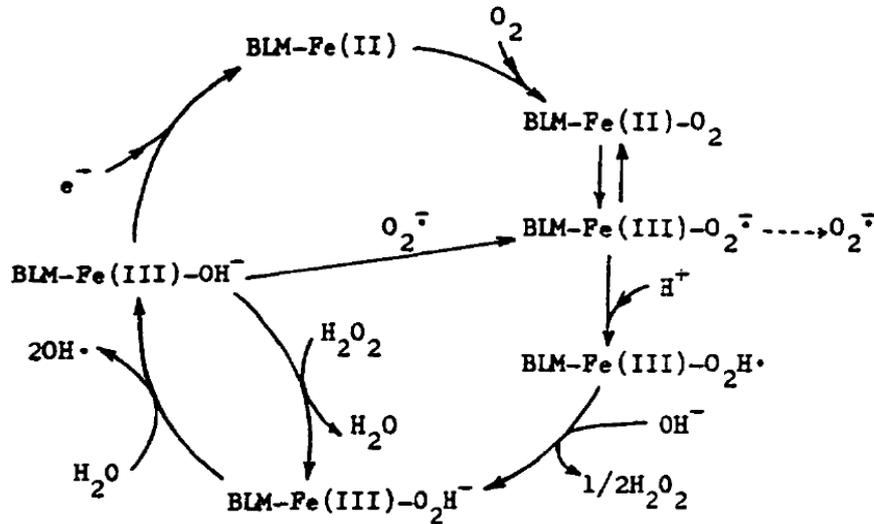
El complejo activado BLM-Fe(II)-O<sub>2</sub> rompe el esqueleto de ADN extrayendo un átomo de hidrógeno del carbono 4' de la desoxirribosa para formar un radical inestable, y el electrón reducido resultante de la activación de la BLM, BLM-Fe(III)-OH<sup>•</sup>, puede llevar a cabo ataques adicionales al ADN. El azúcar inestable así generado puede ser rearrreglado para generar por lo menos cuatro tipos de lesiones oxidativas del ADN (Figura 5), que son estructural y químicamente relacionadas a algunas de las lesiones producidas por radiación ionizante. (Ramotar and Wang, 2003).



**Figura 5:** Lesiones inducidas producidas bajo tratamiento con bleomicina. La producción de diversos tipos de lesiones es dependiente de las condiciones de oxigenación. (Imagen extraída de (Ramotar and Wang, 2003)).

Si estas especies son dejadas a su propio destino, pueden destruirse ellas mismas, oxidar lípidos, hidrolizar enlaces amidas de proteínas, así como también pueden catalizar la formación de lesiones en el ADN de simple y doble hebra (Figura 4). En este caso los daños se producen a través de vías radicalarias mecanísticamente definidas, es decir, la bleomicina activada puede descomponerse para generar radicales hidroxilos que reaccionan rápidamente

y de forma no específica con cualquier molécula que encuentren – efecto radiomimético (Figura 6). (Lim et al., 1995).



**Figura 6:** Formación de radicales libres por reacción redox. Se destacan los radicales superóxido e hidroxilo así como el peróxido de hidrógeno, comunes a este radiomimético y que son también productos radioquímicos del H<sub>2</sub>O producidos por la radiación ionizante. (Imagen extraída de (Chen and Stubbe, 2005; Umezawa et al., 1984)).

Una de las lesiones mutagénicas produce un sitio apurínico/apirimidínico (AP) oxidado donde se pierde la base completa, por lo que deja de haber disponible un molde para la ADN polimerasa. Otro tipo de lesión producida por BLM es la rotura de simple hebra en el ADN donde el extremo 3' finaliza con una porción del anillo de desoxiribosa para formar el 3'- fosfoglicolato. Ésta lesión efectivamente bloquea la síntesis de ADN por la ADN polimerasa. La porción remanente del azúcar fragmentado permanece como la forma libre de la base propanal, la cual tiene la habilidad de reaccionar con el ADN para formar aductos de base. (Lim et al., 1995).

La BLM también produce doble lesión de hebra (by-stranded) en secuencias específicas, como CGCC, que se generan cuando el complejo BLM-Fe(II) crea sitios AP en una cadena y una rotura simple opuesta directamente en la

cadena complementaria. La rotura espontánea del sitio AP por aminas primarias *“in vivo”*, convierte a la doble lesión en una rotura de doble hebra. El tipo de lesión generada por la bleomicina está influido por diversos factores. Por ejemplo, en presencia de oxígeno, la bleomicina produce primariamente roturas de hebra en el ADN, mientras que a baja tensión de oxígeno forma en gran parte sitios AP. Por lo tanto la extensión en la formación de lesiones inducidas por la BLM depende del estatus redox del tipo celular dado. (Ramotar and Wang, 2003).

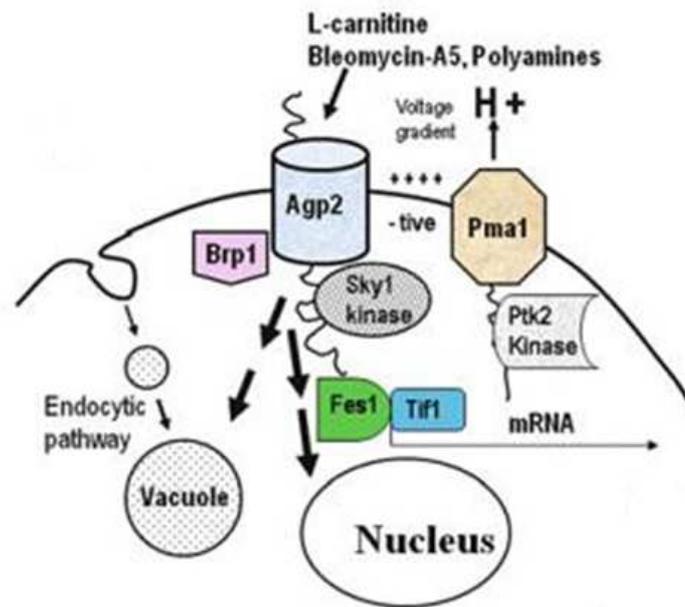
Estudios *“in vitro”* indican que una única molécula de bleomicina es suficiente para generar lesiones en ambas hebras del ADN; la dificultad en la reparación de estas lesiones se ha postulado de ser el factor principal en la citotoxicidad de la droga. (Chen and Stubbe, 2004). Se han identificado puntos calientes (hot spots, del inglés) para la escisión de dobles roturas en el ADN que han llevado a reglas empíricas sobre las secuencias que conducen a las lesiones de este tipo. La observación de que la escisión del ADN fuera eliminada en todos los sitios intranucleosomales potenciales de daño, y no sólo en los sitios de daño en el surco menor del ADN que están protegidos por histonas, indirectamente apoya el modelo de que la unión de bleomicina que lleva a la roturas ocurre por la intercalación de bitiazoles más que por su unión en el surco menor. (Chen and Stubbe, 2005).

Como consecuencia del procesamiento enzimático de las lesiones, producidas por la droga pueden ocurrir eventos potencialmente letales, mutagénicos y recombinogénicos. Mediante análisis cuantitativo, se puede llegar a modelar aspectos relacionados con los numerosos mecanismos moleculares involucrados en estos eventos. Dentro de los modelos matemáticos más utilizados para estos estudios, se encuentran los basados en estadísticas poissonianas que describen los eventos de mutagénesis y sobrevida en función de la dosis de los agentes genotóxicos. (Eckardt and Haynes, 1977; Haynes et al., 1985; Keszenman, 2002; Keszenman et al., 2000; Lillo et al., 2011; Lillo et al., 1997).

Las respuestas celulares a los tratamientos con bleomicina son complejas y dependientes de la línea celular y del genotipo. La prolongada detención del ciclo celular, la apoptosis y la muerte celular mitótica son los resultados más comunes del tratamiento con bleomicina. (Chen and Stubbe, 2005).

### 1.5.3. Transporte de la Bleomicina

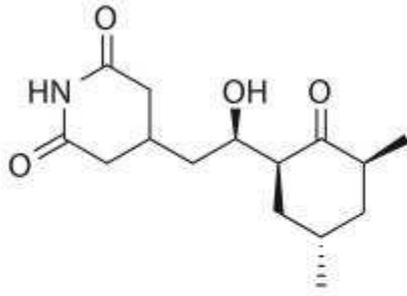
Las bleomicinas son moléculas hidrofílicas incapaces de cruzar la membrana celular por difusión simple. (Chen and Stubbe, 2005). Estudios previos sugieren que la membrana plasmática actúa como una barrera limitando la entrada de la droga a las células. (Ramotar and Wang, 2003). Esto se apoya en la observación de que la electroporación puede incrementar el nivel de BLM en las células de mamífero, aumentando así su genotoxicidad. (Aouida et al., 2003). La primer evidencia de un posible transportador de BLM a la célula provino de un estudio que mostraba que la membrana celular de levaduras y células de mamífero contenía una proteína que unía BLM marcado con <sup>57</sup>Co. (Pron et al., 1993). En un escaneo genómico amplio realizado en una colección mutante haploide de *Saccharomyces cerevisiae* recientemente se identificó el gen *AGP2*, reportado previamente como codificante de una permeasa de L-carnitina, como el encargado de la captación de BLM-A5 en levaduras. (Aouida et al., 2004a; Aouida et al., 2004b). Levaduras carentes de *Agp2* fueron incapaces de tomar BLM-A5 y mostraron una resistencia extrema a la droga, y la sobreexpresión de *Agp2* sensibilizó enormemente las células a BLM-A5, lo cual se correlacionó con un daño aumentado en el ADN (Aouida et al., 2004a). Además, *Agp2* transporta sólo una especie de BLM, llamada BLM-A5, que contiene una fracción espermidina; esto llevó al descubrimiento de que la expresión de *Agp2* es la responsable del transporte de poliaminas de gran afinidad (Figura 7). (Aouida et al., 2005).



**Figura 7:** Modelo que ilustra las vías de transporte y detoxificación de BLM-A5 en levaduras. (Imagen extraída de (Panasci et al., 2013)).

### 1.6. Cicloheximida: Inhibidor de la Síntesis Proteica

La cicloheximida (CHX, Figura 8) es un antibiótico originalmente aislado del microorganismo *Streptomyces griseus*, y es un potente inhibidor de los ribosomas eucarióticos, siendo capaz de bloquear la subunidad 60S de *Saccharomyces cerevisiae*; de esta forma bloquea la elongación de la cadena polipeptídica naciente durante la traducción dificultando la función de EF-2 (factor de elongación 2). (Franklin and Snow, 2005). Al exponer células de levadura a altas dosis de cicloheximida, se observa detención de síntesis proteica así como del crecimiento. (Gerlinger et al., 1997). Al restringir la síntesis proteica debido a la inhibición con CHX, se perviene el “start” del nuevo ciclo celular y las células se frenan en fase G1. (McCusker and Haber, 1988).



**Figura 8:** Estructura de la cicloheximida. (Imagen extraída de (Schneider-Poetsch et al., 2010)).

### **1.7. Hipótesis de Trabajo**

El producto del gen *RAD17* de *Saccharomyces cerevisiae* se encuentra involucrado tanto en funciones de punto de control del ciclo celular, como también en la reparación del ADN.

### **1.8. Objetivos**

Objetivo General:

Investigar los efectos celulares y moleculares que se suceden producto de la exposición de las cepas salvaje y mutante *rad17Δ/rad17Δ* al radiomimético Bleomicina.

Objetivos Específicos:

- a) Determinar la probabilidad de sobrevida en muestras celulares salvajes y mutantes bajo el tratamiento con distintas concentraciones de BLM.
- b) Determinar la cinética de proliferación en función del tiempo bajo distintas concentraciones de BLM y CHX.
- c) Cuantificar roturas dobles del ADN bajo cada tratamiento, estudiando el curso temporal de la recuperación de lesiones al término de los tratamientos.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Se utilizaron cepas isogénicas diploides salvaje y mutante que se describen en la Tabla 2.

Cepa	Genotipo	Fuente
9154	<u><math>\alpha</math> RAD ade2 his3-532 TRP<sup>+</sup> ura3-52</u> $\alpha$ RAD <sup>+</sup> ade2 arg4-17 trp1-289 ura3-52	W. Siede
9156	<u>a rad17<math>\Delta</math>:: kanx ade2 his3-532 TRP<sup>+</sup> ura3-52</u> $\alpha$ rad17 $\Delta$ ::kanx ade2 arg4-17 trp1-289 ura3-52	W. Siede

**Tabla 2.** Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

### 2.2. Medios de Cultivo

Se utilizaron medios de cultivo nutrientes habituales de *S. cerevisiae* descritos en la literatura (Rose et al., 1990), detallados a continuación:

- YPD: Medio nutriente líquido: 1% de extracto de levadura (US Biological), 2% bactopectona (US Biological) y 2% de glucosa (US Biological).
- YPDA: Medio nutriente sólido: YPD + 2% agar (US Biological).

### **2.3. Agentes Químicos**

La bleomicina empleada (BLM:  $C_{55}H_{84}ClN_{17}O_{21}S_3$ , ver Figura 1) es el preparado cristalino de uso clínico (Bleocin, Kayaku Co., Japón). A partir de este se realiza una solución stock de la droga por dilución en agua desionizada estéril a una concentración de  $300\mu\text{g/mL}$ , la cual se almacena a temperatura ambiente. Esta solución es estable durante un año. (Keszenman-Pereyra, 1990).

La cicloheximida (CHX:  $C_{15}H_{23}NO_4$ ) (Sigma) de peso molecular  $281.3\text{ g/mol}$ , se diluye en agua destilada a una concentración de  $10\text{ mg/mL}$  (solución stock), se esteriliza por filtración y se almacena protegida de la luz a  $4^\circ\text{C}$ .

### **2.4. Mantenimiento de las Cepas de *S. cerevisiae***

Las cepas se mantienen en tubos de agar inclinado conteniendo YPDA a  $4^\circ\text{C}$  en la heladera. (Rose et al., 1990).

### **2.5. Condiciones de Crecimiento**

Se realiza un primer pasaje tomando una muestra de células del cultivo perteneciente a una colonia, mantenido en un tubo de agar inclinado utilizando un asa de platino; ésta se siembra en medio nutriente líquido, y se incuba a temperatura óptima de crecimiento ( $30^\circ\text{C}$ ) por 3 o 4 días, con agitación continua.

A partir de este primer pasaje se realiza un segundo pasaje, diluyendo apropiadamente en YPD una alícuota del primer cultivo y dejándolo proliferar durante toda la noche a  $30^\circ\text{C}$  con agitación continua para obtener un cultivo en fase exponencial ( $N = 5-7 \times 10^6$  células/mL). (Keszenman-Pereyra, 1990). El número de células (N) inicial del segundo pasaje para cada cepa así como el tiempo de incubación necesario para alcanzar la fase de crecimiento exponencial (dependiente del tiempo de duplicación celular), se determinó por análisis de la cinética de crecimiento poblacional de cada cepa que se describe

a continuación.

## **2.6. Tratamiento con Bleomicina (BLM)**

Las muestras celulares fueron lavadas dos veces, resuspendidas en agua desionizada ( $N = 1 \times 10^8$  células/mL) e incubadas con BLM a distintas concentraciones (0 - 3  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 1.5h a 30°C en un agitador orbital.

## **2.7. Análisis de Sobrevida**

Las poblaciones celulares de la cepa salvaje y mutante crecidas en medio nutriente, YPD, a 30°C con agitación, fueron centrifugadas y lavadas dos veces con agua desionizada. Se concentraron en un orden de 20 veces para la población exponencial para obtener un  $N \approx 1 \times 10^8$  células/mL, adecuado para efectuar el tratamiento con BLM. Inmediatamente fueron divididas e incubadas con concentraciones crecientes de BLM (0  $\mu\text{g/mL}$ , 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$ , 3  $\mu\text{g/mL}$  y 6  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 1.5h a 30°C con agitación continua. La selección de las dosis de BLM se realizó tomando en consideración la información de experimentos previos realizados con anterioridad en nuestro laboratorio, donde a dosis mayores a 6.0  $\mu\text{g/ml}$  de BLM la letalidad de ambas cepas fue elevada.

Para el análisis de sobrevida en lo inmediato, se centrifugaron y lavaron las muestras celulares sólo una vez con agua destilada luego del tratamiento; se efectuaron diluciones y se sembraron inmediatamente en el orden de  $1 \times 10^3$  células/mL, en placas con medio sólido, YPDA (0.2 mL/placa). Luego se incubaron a temperatura óptima de crecimiento durante 3 a 4 días.

Para el análisis de sobrevida se contaron las colonias visibles, mayores o iguales a 1 mm de diámetro (200 - 400 colonias por placa) y se calculó de acuerdo a Eckardt y Haynes (1977). La probabilidad de sobrevida se estima por la fracción sobreviviente  $S(x)$  para cada dosis de BLM, siendo:

$$S(x) = N_s(x) / N_s(o)$$

donde  $N_s(x)$  es el número total de células capaces de multiplicarse y por tanto de sobrevivientes para cada dosis y  $N_s(0)$  es el número de células sembradas a la dosis (BLM) = 0  $\mu\text{g/mL}$  (colonias de la muestra control). Cada valor numérico representado en los gráficos corresponde a los promedios de tres experimentos reproducibles. Los intervalos de confianza se calcularon según la distribución binomial ( $P \geq 0.95$ ).

## **2.8. Cinética de Proliferación Celular en Medio Sólido**

Para realizar los estudios de proliferación celular se procedió de igual forma que para el análisis de sobrevivencia pero sembrándose entre  $5 \times 10^5$  y  $5 \times 10^6$  células/placa de todas las cepas bajo todos los tratamientos en placas de Petri de 5cm de diámetro en medio sólido nutriente. Se determinaron las frecuencias relativas de conjuntos celulares conteniendo 1, 2-3, 4-7, y más de 8 células en función del tiempo de incubación (0 a 20h; se contaron más de 500 conjuntos celulares por placa). (Keszenman et al., 2005). Se tuvieron en cuenta los marcadores morfológicos de las fases del ciclo celular y se procesaron en base a modelos de crecimiento en medio sólido. El marcador fisiológico que se siguió fue la relación tamaño de la gema - tamaño de la célula madre. Se consideró dentro del conjunto de una célula a aquellas sin brote (fase  $G_1$ ), y aquellos con un brote que no supere las dos terceras partes del tamaño de la madre (fase  $S/G_2$ ). Si la célula hija supera esa proporción y aún está unida a la célula madre se la considera como dos células (fase M). También forman parte de este grupo los conjuntos de 3 células. (Nunes and Pohlit, 1968a; Nunes and Pohlit, 1968b).

## **2.9. Determinación de la Reparación de Roturas Dobles del ADN (DSBs)**

Para el análisis de recuperación por mantenimiento en medio líquido (LH, liquid holding), inmediatamente luego del tratamiento con BLM, las células se lavaron dos veces con agua desionizada y se resuspendieron a una concentración

celular de  $2 \times 10^6$  células/mL en medio nutriente líquido YPD durante 18h a 30°C.

De manera de inhibir la síntesis proteica inducible, se llevó a cabo el tratamiento con CHX al término de la exposición a BLM. Las muestras control y tratadas con BLM en fase exponencial se colocaron en YPD conteniendo CHM a una concentración final de 100 µg/mL, con agitación continua a 30°C. La dosis de CHM fue seleccionada según análisis bibliográfico e investigaciones realizadas por los integrantes del laboratorio. (Keszenman et al., 1996; Siede et al., 1983).

## **2.10. Determinación de las DSBs del ADN**

El análisis de roturas dobles del ADN se efectuó a partir del aislamiento del ADN de muestras de ambas cepas de levadura bajo los distintos tratamientos (control y tratadas), utilizando electroforesis por campos pulsados transversos alternados (TAFE) y posterior cuantificación de DSBs por densitometría laser (densitómetro láser LKB Ultrosan XL) por medio del programa GelScan XL (versión 2.1, Pharmacia) (Baur, 1990; Friedl et al., 1998; Keszenman et al., 2000). Para calcular el número de DSBs por genoma se aplicó la distribución de Poisson.

## **2.11. Electroforesis por Campos Pulsados Transversos Alternados (TAFE)**

El TAFE (transverse alternating field electrophoresis) es una simple técnica electroforética de alta resolución para la separación de moléculas o fragmentos de ADN que varían en tamaño, desde unos pocos miles hasta aproximadamente 7 millones de pares de bases (1 a 10.000 kb), permitiendo así la separación de cromosomas enteros (o parte de los mismos) de diferentes organismos eucariotas. (Gardiner and Patterson, 1989).

Ésta técnica utiliza un gel vertical y un simple arreglo de electrodos para producir campos eléctricos uniformes a todo lo largo de los carriles. Las moléculas de ADN son forzadas a moverse en el gel de agarosa cambiando su migración periódicamente de acuerdo a los potenciales de los electrodos. De esta manera se logra una migración diferencial en función del tamaño de las moléculas de ADN. Tanto la concentración de agarosa, la duración de los pulsos, la temperatura de la corrida electroforética, así como la geometría de los campos pulsados y la topología del ADN, son los principales parámetros que están involucrados en el resultado del TAFE. (Gardiner, 1990; Gardiner, 1991; Geigl and Eckardt-Schupp, 1991; Schwartz and Cantor, 1984).

#### *2.11.1. Aislamiento del ADN en Bloques de Agarosa*

Las muestras celulares conteniendo aproximadamente  $1 \times 10^9$  células/mL fueron lavadas dos veces con buffer fosfato salino (PBS) (pH 7.4) y el precipitado celular fue a continuación guardado en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento (Keszenman, 2002).

Procedimiento de Aislamiento del ADN:

1. Lavar las muestras celulares dos veces con buffer de fosfato de potasio 0.5M (pH 7) y resuspender en 0.5 mL de este buffer y pasarlas a tubos Eppendorf.
2. Agregar 0.1mL de EDTA 0.5M (pH 9) obteniéndose una concentración de EDTA final equivalente a 0.1M.
3. Centrifugar y resuspender en 0.3mL de EDTA 50mM (pH 7.5).
4. Agregar 0.1mL de Solución 1. Agitar con vortex.
5. Agregar 0.4mL de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma) al 2%, disuelta en EDTA 0.125M, manteniéndola a  $42^{\circ}\text{C}$  con agitación.
6. Repartir en bloques de 60  $\mu\text{L}$  utilizando el molde correspondiente. Solidificar en heladera a  $4^{\circ}\text{C}$ .

7. Colocar los bloques en tubos de vidrio y agregar 1.8mL de Solución 2. Incubar los bloques a 37°C durante 1h.
8. Descartar la solución 2. Agregar 1 mL de Solución 3 e incubar durante toda la noche a 50°C con agitación suave.
9. Descartar la Solución 3 y dializar en Solución 4 durante 36h. Se deben realizar por lo menos 8 cambios de Solución 4 a intervalos regulares.
10. Los bloques de agarosa se guardan en solución a 4°C.

**Solución 1:**

1.33 mg zymolasa (60.000U)

0.2 mL SEC buffer

10 µL β-mercaptoetanol

**Solución 2:**

1.8 mL EDTA 0.5 M

20 µL Tris 1M

30 µL agua

**Solución 3:**

1.8 mL EDTA 0.5 M

20 mg N-laurylsarcosinato

20 µL Tris-HCl 1M

2 mg Proteinasa K

**Solución 4:**

Tris-HCl 10 mM pH 7.5 (PM = 157.6 g/mol)

EDTA 10 mM

PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride) (PM = 174.2 g/mol)

***SEC buffer:***

Sorbitol 1M (PM = 182.2 g/mol)

Citrato monohidrato 10 mM (PM = 210.14 g/mol)

Fosfato disódico 10 mM (PM = 142 g/mol)

EDTA 0.1M (PM = 292.2 g/mol)

***Buffer fosfato:***

Fosfato dipotásico 0.5M (PM = 174.2 g/mol)

Fosfato monopotásico 0.5M (PM = 136.1 g/mol)

***TAFE buffer 20X:***

Tris-base 24.9g

EDTA 2.9g

Ácido Acético glacial 5mL

Agua destilada

### ***Solución de PBS:***

Para 1 litro:

NaCl            8g

KCl             0.2g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>    1.44g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>     0.24g

Agregar 800mL de agua y ajustar a pH 7 con HCl 1 litro.

#### *2.11.2. Condiciones de la Corrida Electroforética*

El programa para la corrida electroforética utilizado (puesto a punto por el equipo de Radiobiología) fue:

Fase 1: duración 12h, pulsos de 1 minuto a una corriente de 350 mA.

Fase 2: duración 8 h, pulsos de 2 minutos a una corriente de 390 mA.

Fase 3: duración 4-6h, pulsos de 3 minutos a una corriente de 370 mA.

#### *2.11.3. Tinción del Gel*

Luego de terminada la corrida electroforética se coloca el gel en buffer TAFE 1X con 0.002% de bromuro de etidio durante 1h a temperatura ambiente en ausencia de luz. Seguidamente se coloca el gel en una solución conteniendo Ribonucleasa A (1µg/mL) en buffer TAFE 1X, durante 4h a 37°C.

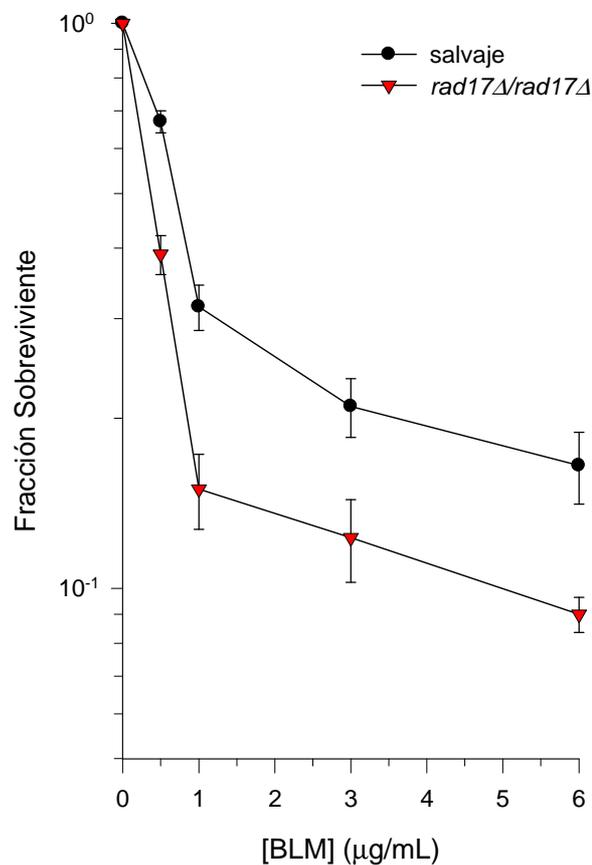
#### *2.11.4. Fotografiado del Gel*

Se colocó el gel en transiluminador UV y se fotografió con cámara Polaroid, film tipo 665. El negativo obtenido se analizó utilizando un densitómetro láser.

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Análisis de Sobrevida Bajo Tratamiento con Bleomicina

A partir de los datos obtenidos mediante el estudio de la cinética de crecimiento evaluamos los daños producidos por la BLM en ambas poblaciones celulares. Tomando en cuenta los estudios previos decidimos trabajar en un rango de concentración de la droga medido en  $\mu\text{g/mL}$  de  $0 \leq \text{BLM} \leq 6$ . (Figura: 9).



**Figura 9:** Fracciones sobrevivientes correspondientes a poblaciones salvaje y mutante en función de la concentración de BLM.

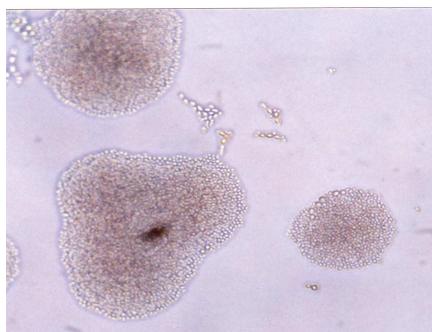
Primeramente se observa que ambas curvas presentan una disminución de la sobrevida en función de la concentración de BLM. De hecho, las dos poblaciones celulares presentan dos componentes de distinta sensibilidad; uno

de mayor pendiente, correspondiente a concentraciones entre 0 y 1  $\mu\text{g/mL}$  (bajas dosis), y un segundo componente más resistente a concentraciones mayores a 1  $\mu\text{g/mL}$ . En particular, el tratamiento a bajas dosis de BLM induce significativamente más letalidad en la cepa mutante *rad17 $\Delta$ /rad17 $\Delta$*  que en la salvaje.

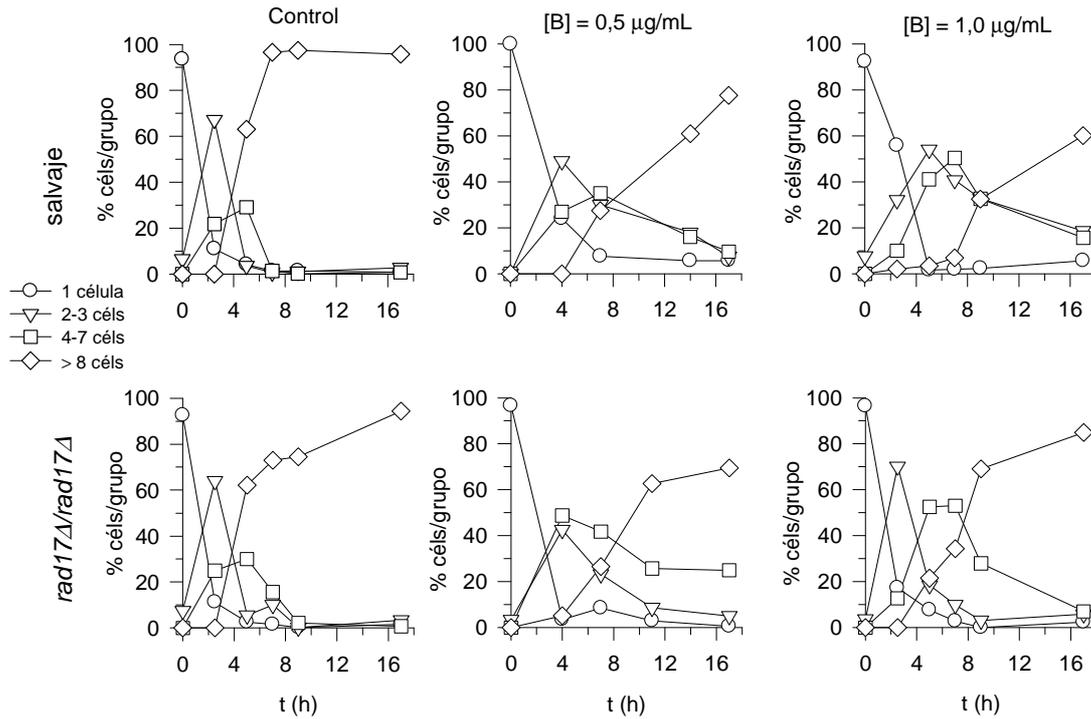
### 3.2. Estudio de la Cinética de Proliferación Celular

Al término del tratamiento con BLM, parte de las células fueron sembradas en medio nutriente sólido y se estimó microscópicamente la cinética de proliferación determinando la frecuencia de grupos celulares conteniendo 1, 2-3, 4-7 o más de 8 células en función del tiempo de incubación en YPDA (Figura: 11). Hay que resaltar que el grupo celular conteniendo 1 célula o célula en gemación con una gema menor a 2/3 partes del tamaño de la célula madre, incluye así a las células en fase G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>.

Se midieron los retrasos según la distancia entre los valores máximos en cada curva (escala de tiempo). La exposición a bleomicina en ambas cepas produjo diferentes fracciones de de colonias abortivas ( $N \geq 8$ , muerte diferida), y células gigantes. Dichas células gigantes son agrupaciones celulares que han llevado a cabo pocas divisiones celulares, no presentando separación celular entre la célula madre y su hija (Figura 10).



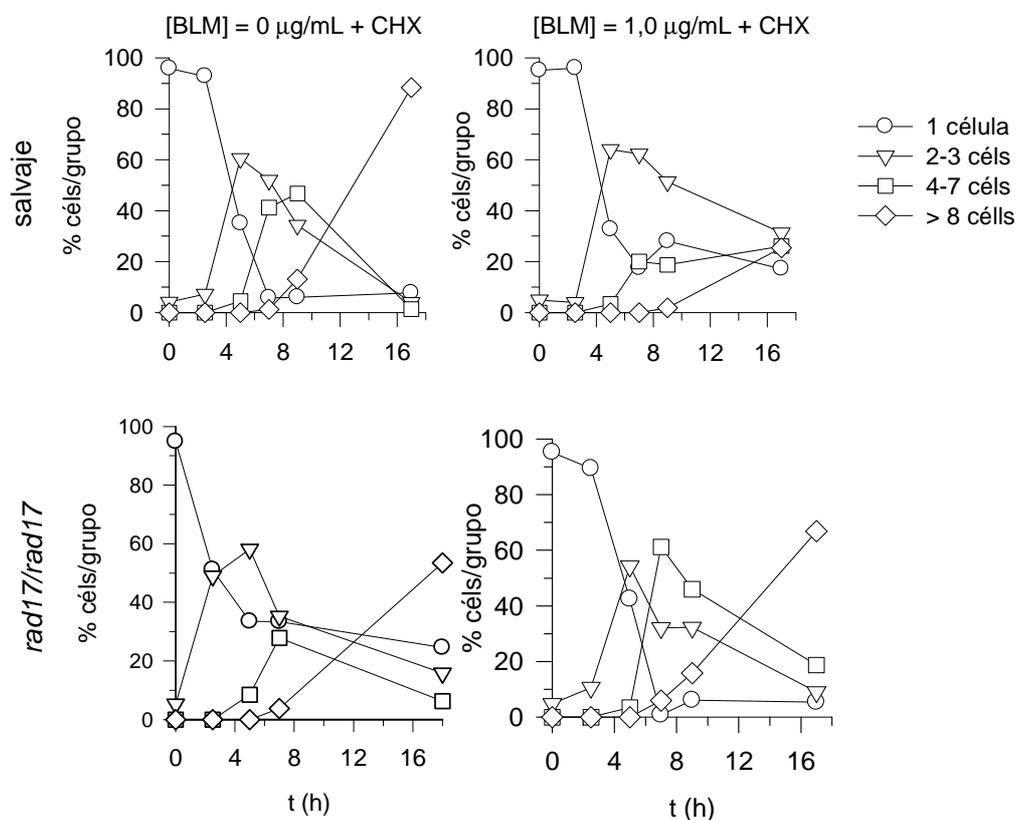
**Figura 10:** Microscopía óptica de microcolonias ( $N \geq 100$  células) y conjuntos de células gigantes (muerte celular diferida) ubicados sobre el centro de la fotografía.



**Figura 11:** Cinética de proliferación correspondiente a las muestras tratadas con 0, 0,5 y 1,0  $\mu\text{g/mL}$  de BLM y sembradas en medio nutriente sólido (YPDA). La cepa salvaje se encuentra en la fila de arriba, mientras que la de abajo corresponde a la cepa *rad17/rad17*. Frecuencia relativa de grupos celulares conteniendo 1 ( $\circ$ ), 2-3 ( $\nabla$ ), 4-7 ( $\square$ ) o  $\geq 8$  células ( $\diamond$ ).

Entre los controles no tratados, las cepas salvaje y *rad17/rad17* no mostraron una velocidad proliferativa significativamente diferente (test de distribución binomial,  $P < 0.05$ ). Por ejemplo, luego de 4h de sembrado, los grupos conteniendo 1 célula (sin división) representaron sólo el 10% en la cepa salvaje y un 5% en la cepa mutante *rad17/rad17* (vértice inferior izquierdo de la Figura 11). Más aún, en comparación con la cepa no tratada correspondiente, un corto retraso en la división fue producido por 0.5 $\mu\text{g/mL}$  de BLM en la cepa salvaje, mientras que no se observó ningún retraso para la cepa mutante con esta dosis. El tratamiento con 1,0 $\mu\text{g/mL}$  de BLM produjo retrasos mayores que a 0,5 $\mu\text{g/mL}$  en la cepa salvaje. Los retardos en la cepa salvaje también fueron mayores comparados con la cepa mutante, incluso en la medida realizada

luego de tres ciclos celulares (por ejemplo: 8 células/grupo). En general, los retrasos en las divisiones aumentan al aumentar la dosis de BLM en ambas cepas, pero el patrón es diferente. Por ejemplo, luego del tratamiento con 1µg/mL de BLM, los grupos conteniendo 2 y 3 células alcanzan el máximo luego de 5h en la cepa salvaje y luego de 2.5h en la mutante *rad17/rad17*. El grupo celular conteniendo de 4 a 7 células alcanzó el máximo en la muestra control de la cepa salvaje a las 5h; luego del tratamiento con 1µg/mL de BLM, este máximo fue retrasado 2h más, mientras que ningún retraso relativo a los controles no tratados fue detectado para la mutante.

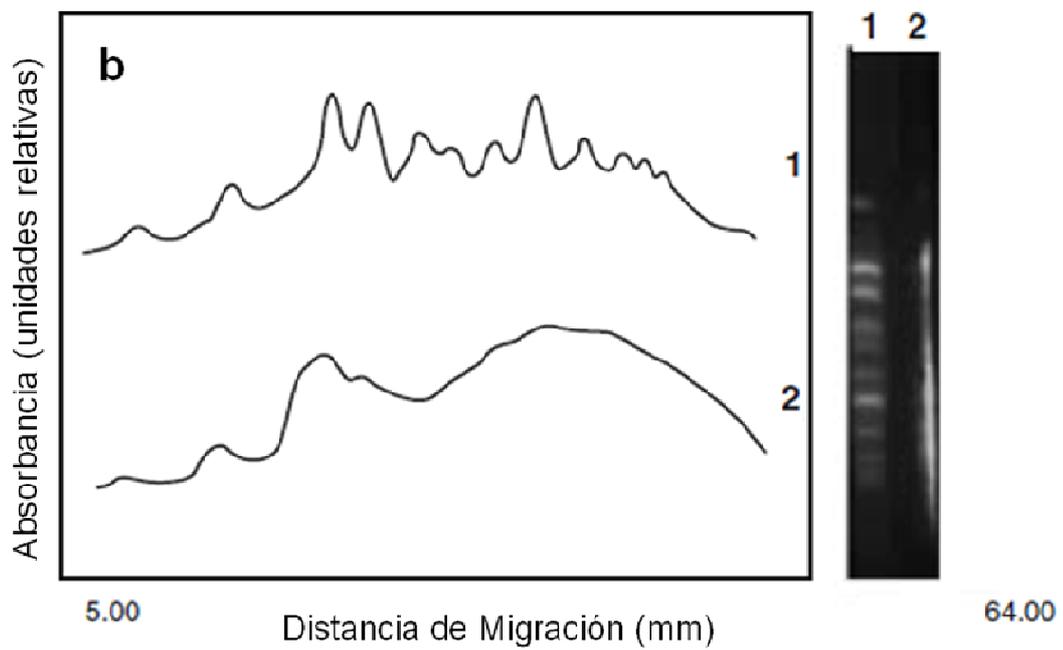
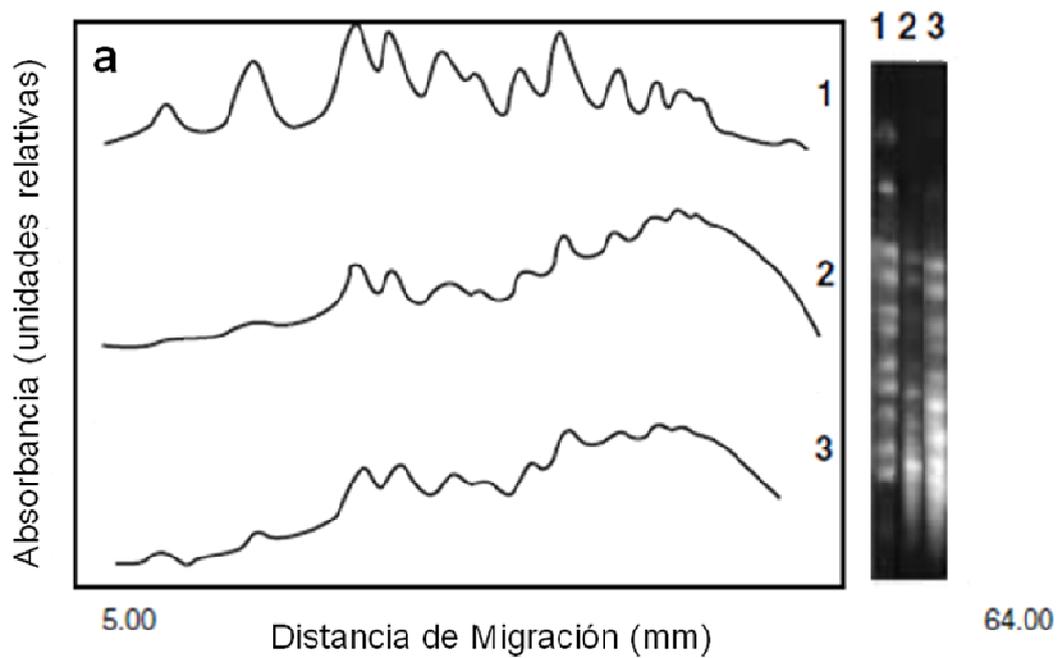


**Figura 12:** Cinética de proliferación correspondiente a muestras sometidas a recuperación en YPD en presencia de CHX luego del tratamiento con BLM, sembradas en medio sólido (YPDA). La cepa salvaje se encuentra en la fila de arriba, mientras que la de abajo corresponde a la cepa *rad17/rad17*. Frecuencia relativa de grupos celulares conteniendo 1 (○), 2-3 (▽), 4-7 (□) o  $\geq 8$  células (◇).

Como se puede apreciar en la Figura 11, la CHX por si sola (incubación por 1.5 a 18h) induce retrasos en la división similares en ambas muestras control con énfasis a las 5h, y una tendencia más marcada en la cepa mutante. Además se observan retardos diferenciales adicionales luego de la combinación con BLM, más notorios que aquellos de la Figura 11 (Figura 12). Es relevante el retraso en la progresión de 1 célula al grupo conformado por 2 a 3 células bajo tratamiento de BLM; en ambas cepas al cabo de 3 horas casi el 100% de las células se encuentran en la agrupación de 1 célula (Figura 12). Por tanto, la CHX tiene un efecto inhibitorio en la progresión del ciclo que es independiente del genotipo de las cepas.

### **3.3. Determinación de las Dobles Roturas de Cadena y su Reparación**

La Figura 13 a y b muestra los densitogramas láser del análisis de la electroforesis en gel de campos pulsados (TAFE) de ADN aislado de muestras salvaje y su mutante isogénica expuestas a 0,5 µg/mL de BLM. Las muestras fueron incubadas por más de 18h en medio nutriente líquido (YPD). Se aplicó la distribución de Poisson para el cálculo de DSBs por genoma. En la Tabla 3 se observan los valores promedios y los correspondientes errores estándares que derivan de al menos tres experimentos independientes conducidos en cada cepa de levadura.



**Figura 13:** Densitogramas láser (absorbancia en función de la distancia de migración en el gel) de perfiles de TAFE de muestras salvaje y *rad17/rad17* tratadas con 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de BLM. Las células fueron analizadas

inmediatamente luego del tratamiento ( $t=0$ , panel a), o incubadas en medio nutriente YPD por 18h ( $t=18h$ , panel b). Las fotografías a la izquierda de cada figura muestran los perfiles de TAFE usados para generar los trazados densitométricos, ubicados a la izquierda. **Panel a:** de arriba a abajo (los trazados corresponden a los perfiles 1-3 del lado derecho): muestra control (perfil 1), salvaje tratada (perfil 2) y *rad17/rad17* tratada (perfil 3). **Panel b:** de arriba abajo: salvaje tratada (perfil 1) y mutante tratada (perfil 2).

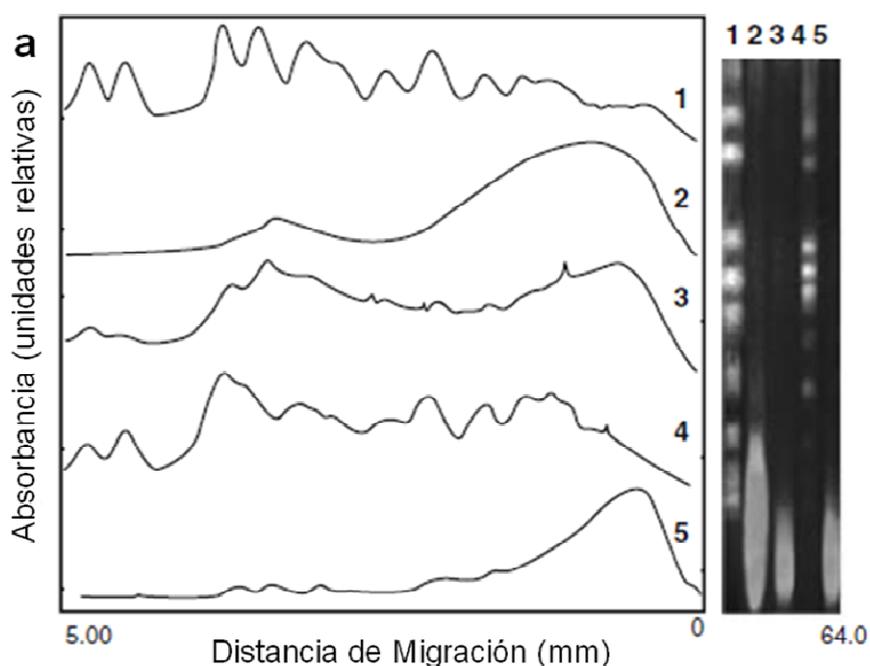
Cepas	DSB* $t=0$	DSB* (YPD, $t=18h$ )	DSB* (YPD + CHX, $t=18h$ )	Nm/No**
[BLM] = 0,5 $\mu$ g/mL				
salvaje	2,5 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,2	18 $\pm$ 1,8	0,67 $\pm$ 0,03
<i>rad17<math>\Delta</math>/rad17<math>\Delta</math></i>	3,0 $\pm$ 0,3	> 20	> 20	0,39 $\pm$ 0,03
[BLM]= 3,0 $\mu$ g/mL				
salvaje	> 20	2,2 $\pm$ 0,2	> 20	0,21 $\pm$ 0,02
<i>rad17<math>\Delta</math>/rad17<math>\Delta</math></i>	> 20	2,5 $\pm$ 0,3	> 20	0,12 $\pm$ 0,02

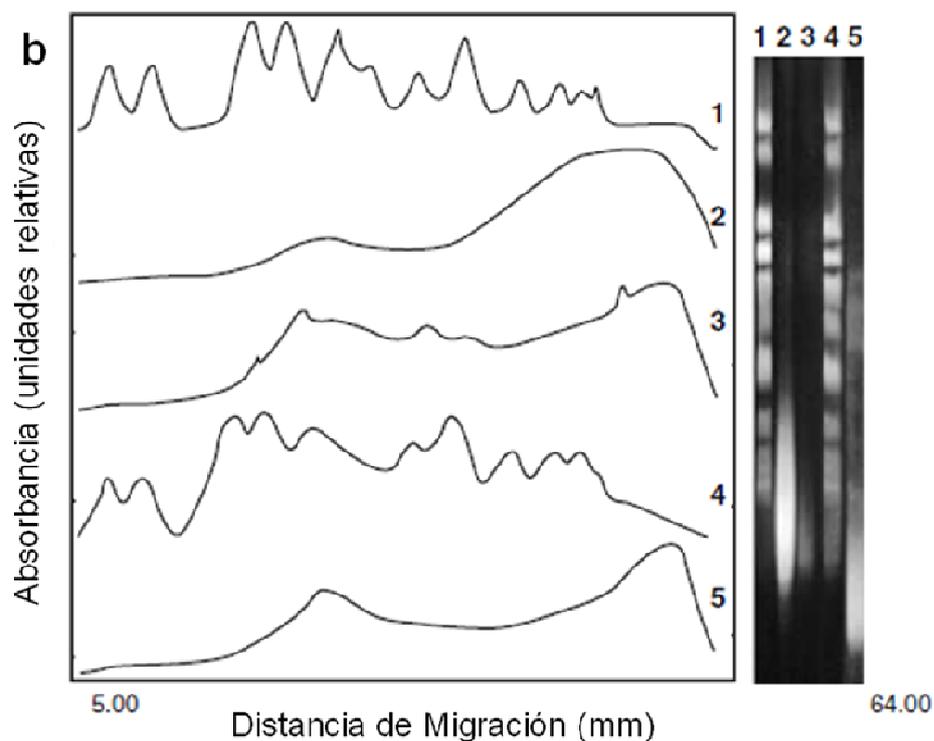
**Tabla 3.** Fracciones sobrevivientes (Nm/No) y reparación de dobles roturas de cadena de cepas salvaje y mutante expuestas a diferentes concentraciones de BLM. \* Valor promedio de DSB por genoma  $\pm$  error estándar; \*\* Promedio de las fracciones sobrevivientes e intervalos de confianza correspondientes ( $P = 0.95$ ).

En las muestras de poblaciones salvajes que fueron sometidas a mantenimiento en YPD, se observó una recuperación cromosómica significativa dependiente del tiempo, dado por el descenso en DSBs luego de la incubación. ( $DSB_{t=0h} = 2.5 \pm 0.3$ ;  $DSB_{t=2.5h} = 1.5 \pm 0.3$ ;  $DSB_{t=7h} = 0.5 \pm 0.2$ ;  $DSB_{t=18h} = 0.5 \pm 0.2$ ) (Figura 13 a y b, Tabla 3). La cepa mutante *rad17/rad17* no mostró reparación de DSBs, con un aumento en la degradación del ADN durante la

incubación en YPD ( $DSB_{t=0h} = 3.0 \pm 0.3$ ;  $DSB_{t=2.5h} = 3.5 \pm 0.6$ ;  $DSB_{t=7h} = 5.5 \pm 0.6$ ;  $DSB_{t=18h} \geq 20$ ) (Figura 13 a y b, Tabla 3).

Tomando en consideración los datos obtenidos mediante el análisis de sobrevivencia sobre el compartimento resistente ( $1 \leq BLM \leq 6 \mu\text{g/mL}$ ), fue pertinente realizar corridas electroforéticas para ahondar sobre la posibilidad de expresión de reparación de ADN inducido por BLM. Para ello, células de levadura fueron expuestas a  $3,0\mu\text{g/mL}$  de BLM y luego se las hizo crecer en YPD en presencia y ausencia de CHX; las DSBs fueron monitoreadas por un lapso de 18h. La adición de CHX tuvo un efecto inhibitorio sobre la recuperación cromosómica en la cepa salvaje (Figura 14, Tabla 3). No se observó ningún efecto causado por CHX sobre la degradación del ADN en la cepa mutante *rad17/rad17* (Figura 14, Tabla 3).





**Figura 14:** Densitogramas láser (absorbancia en función de la distancia de migración en el gel) de perfiles de TAFE de muestras salvaje y *rad17/rad17* tratadas con 3,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BLM y luego incubadas en YPD. **Panel a:** cepa salvaje; **Panel b:** mutante *rad17/rad17*. Las fotografías en los paneles de la derecha de la Figura a y b muestran los perfiles de TAFE del gel (líneas 1-5), que fueron usadas para generar los trazados densitométricos de la izquierda. De arriba abajo en ambos paneles: muestra control,  $t=0$  (perfil 1); 3,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BLM a  $t=0$  (perfil 2); 3,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BLM,  $t=6\text{h}$  (perfil 3); 3,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BLM,  $t=18\text{h}$  (perfil 4); 3,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BLM + CHX,  $t=18\text{h}$  (perfil 5).

Cuando las medidas fueron realizadas inmediatamente luego del tratamiento, esta dosis de BLM produjo niveles significativamente más altos de degradación de ADN que aquellos observados para 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BLM (comparar Figuras 13, 14, también Tabla 3). Luego del tratamiento con estas concentraciones altas de BLM, ambas cepas mostraron recuperación cromosómica luego de la incubación en medio nutriente (Figura 14 a y b; Tabla 3). En particular, la

mutante *rad17/rad17* mostró clara reparación de DSB luego del tratamiento con 3,0µg/mL de BLM (Figura 14b), similar a la salvaje. Además, la reparación de DSB en ambas cepas salvaje y *rad17/rad17* fue inhibida por CHX. Es de hacer notar que la CHX en sí misma no tuvo un efecto significativo en los perfiles cromosómicos, dando valores de absorbancia similares a aquellas muestras controles no tratadas.

#### IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Una vez que se produce daño en el material genético, y bajo ciertas condiciones, distintas maquinarias moleculares se activan para cumplir diferentes funciones. Bien es sabido que las proteínas implicadas en los puntos de control del ciclo celular proveen tiempo necesario y suficiente para que la maquinaria de reparación se ponga en juego y enmiende las lesiones detectadas. No obstante, nuevas investigaciones vienen aportando información relevante sobre las proteínas involucradas en estos puntos de control; al parecer y de acuerdo a nuestros resultados podrían también tener roles directos e indirectos en una red de otras funciones relacionadas con la reparación que son desencadenadas por el daño al ADN. (Baldo et al., 2012; Bracesco et al., 2013).

Durante la realización de la presente tesis se investigó el rol del gen *RAD17*, bajo el análisis de sobrevida y en la capacidad de restaurar la integridad del genoma debido a las roturas de doble hebra producidas por la exposición de células en fase exponencial a concentraciones crecientes de la droga bleomicina. (Bracesco et al., 2007).

Tanto la cepa salvaje como su mutante isogénica presentaron degradación cromosómica dependiente de concentración inmediatamente luego del tratamiento con BLM. Mientras que la cepa salvaje incubada por 18hs en medio nutriente líquido presentó recuperación del daño (DSBs inducidas por el agente) (Figuras: 13 y 14), también se observó un enlentecimiento en su cinética de proliferación (Figura 11). En cambio, la mutante *rad17/rad17* no mostró un retardo comparable respecto a su control no tratado correspondiente (Figura 10).

Bajo el tratamiento de mantenimiento en medio de cultivo de la cepa salvaje tratada con CHX se observó inhibición de recuperación cromosómica (Figuras 13b y 14a). Esto indicaría que la respuesta a dichos daños se produce por un componente inducible en la respuesta a la reparación de DBSs que podría

deberse tanto a la recombinación homóloga inducible (Cole et al., 1987; Letavayova et al., 2006), a la replicación post-replicativa (Ulrich, 2002), y en menor medida a la NHEJ, puesto que su contribución es muy baja en la cepa salvaje de *S. cerevisiae* en fase exponencial. De hecho, resultados de nuestro laboratorio indican que el gen *RAD6* está involucrado en la reparación del daño producido por ambos tipos de dosis de BLM, bajas y altas (Keszenman et al., 1992; Keszenman et al., 2005), y que la NHEJ se activa en fase G1, en fase estacionaria. (Nunes et al., 2008).

La ausencia de reparación de DSBs en las células mutantes *rad17/rad17* expuestas a 0,5µg/mL de BLM sugiere un rol importante para el producto génico *RAD17* en la reparación de células en fase exponencial a niveles relativamente bajos de daño en el ADN (Figura 13b, Tabla 3). Un rol similar para *RAD17* fue revelado durante la recuperación en medio líquido de células irradiadas en fase estacionaria (Candrea et al., 2004). No obstante, ésta cepa mostró reparación funcional de las DSBs a concentraciones altas de BLM, donde pudo observarse su sensibilidad a la CHX (Figura 14b). Así también la cepa salvaje, presentó un componente resistente en la curva de sobrevivencia a altas concentraciones (Figura 9, Tabla 3). En consecuencia, luego de niveles relativamente elevados de daño en el ADN ( $DSB \geq 20$ ), algún tipo de reparación de DSBs sensible a la cicloheximida debería actuar independientemente del producto del gen *RAD17*. Una vía alternativa que podría procesar las lesiones producto de la BLM sería la vinculada al complejo Mre11/Rad50/Xrs2 (MRX/hMRN) (Errol C. Friedberg et al., 2006), actuando quizás como sensor de daño similar a la lanzadera Rad17/Mec3/Ddc1. El complejo Mre11/Rad50/Xrs2 es uno de los primeros complejos que se reclutan al sitio donde se produjo la DSB y es esencial para el comienzo de la señal de control así como también para el proceso de reparación. (Baldo et al., 2012). De esta forma, los resultados aquí descritos indican la posibilidad de que una única vía de señalización actúe a bajos niveles de daño en el ADN (por ejemplo: pérdida de bases, roturas simples de cadena y DSBs), y que otra(s) vía(s) procesen las lesiones a altos niveles de daño. Más aún, el hecho de que ambas cepas presenten un componente resistente en las curvas de sobrevivencia

(Figura 9), podría manifestar las diferentes eficiencias de vías de reparación alternativas y su regulación bajo diferentes escenarios enzimáticos.

Del mismo modo, usando la cepa mutante *rad52/rad52*, otros autores no encontraron previamente reparación de DSBs a bajas dosis de BLM, pero una reparación eficiente (probablemente por NHEJ) a altas dosis. (Moore et al., 2000). Las contribuciones diferenciales de NHEJ y HR a la reparación del daño en el ADN inducido por BLM en levaduras fueron demostradas por (Letavayova et al., 2006). Interesantemente, en este y otros casos, la sensibilidad biológica relativa para la inducción de DSB fue diferente de aquella de letalidad, ya que la BLM puede inducir potencialmente otros daños letales aparte de las DSBs. (Chen and Stubbe, 2004; Lillo et al., 1997; Lim et al., 1995; Moore, 1978; Ramotar and Wang, 2003).

Respecto al complejo 9-1-1/Rad17-Mec3-Ddc1, estudios previos demostraron que juega un rol importante en la reparación de dobles roturas. En *S. cerevisiae*, la eliminación del cargador de la lanzadera Rad24-RFC y de la subunidad Rad17 de la lanzadera lleva a un descenso en la sobrevivencia por la introducción de DSBs producidos enzimáticamente. (Aylon and Kupiec, 2003). Más aún, y al igual que en nuestros resultados, los autores mencionados observaron que el descenso en la viabilidad incluso no fue revertido cuando la progresión en el ciclo celular fue enlentecida para permitir la reparación del ADN, sugiriendo que el complejo de lanzadera juega un rol directo en la reparación. Además, se sabe que la fosforilación de Rad17 es dependiente de ATR (scMec1-Ddc2) (Cimprich and Cortez, 2008), y la fosforilación de Mec1 puede ocurrir a su vez de forma independiente del complejo homólogo a 9-1-1 (Aylon and Kupiec, 2004). Se reportó que estos complejos están involucrados y funcionan en la vía de Rad9 en otro punto de control de daño en el ADN. (Baldo et al., 2012). Además se confirma el hecho de que Mec1 (en levaduras), es el principal protagonista de la activación de los puntos de control frente a cualquier tipo de daño en el ADN. (Novarina et al., 2011).

A su vez, Rad1 (scRad17) aislada ha sido reportada como una nucleasa, aumentando la posibilidad que Rad1 quizás participe en el procesamiento de

las DSBs a SSBs (Bessho and Sancar, 2000). Sin embargo, otros trabajos no han confirmado que Rad1, solo o formando parte del complejo 9-1-1, sea una nucleasa funcional. Una explicación alternativa es que el complejo 9-1-1 sirva como lanzadera corrediza, que amarra a las enzimas de procesamiento que metabolizan las dobles roturas de cadena en regiones de simple hebra para la reparación de la rotura. (Parrilla-Castellar et al., 2004).

En conclusión, las observaciones en el presente trabajo, y los hallazgos recabados por otros autores, proponen la presencia de conmutadores moleculares que permiten canalizar las señales a diversos caminos de reparación; para ello se deberá determinar la compleja red de interacciones proteínas-proteínas, de forma de incrementar progresivamente el conocimiento del número de interacciones físicas entre las proteínas del control y los factores de reparación, para fortalecer y expandir el modelo que describe las conexiones funcionales entre estas dos vías claves de la estabilidad genómica. La investigación usando dobles y triples mutantes podría esclarecer estas vías complejas y las correspondientes redes funcionales que interaccionan.

## V. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B., Bray D. (2006) *Introducción a la Biología Celular* Editorial Médica Panamericana.
- Aouida M., Poulin R., Ramotar D. (2010) The human carnitine transporter SLC22A16 mediates high affinity uptake of the anticancer polyamine analogue bleomycin-A5. *J Biol Chem* 285:6275-84. DOI: M109.046151 [pii]10.1074/jbc.M109.046151.
- Aouida M., Tounekti O., Belhadj O., Mir L.M. (2003) Comparative roles of the cell wall and cell membrane in limiting uptake of xenobiotic molecules by *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2012-4.
- Aouida M., Leduc A., Wang H., Ramotar D. (2004a) Characterization of a transport and detoxification pathway for the antitumour drug bleomycin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 384:47-58. DOI: 10.1042/BJ20040392BJ20040392 [pii].
- Aouida M., Leduc A., Poulin R., Ramotar D. (2005) AGP2 encodes the major permease for high affinity polyamine import in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280:24267-76. DOI: M503071200 [pii]10.1074/jbc.M503071200.
- Aouida M., Page N., Leduc A., Peter M., Ramotar D. (2004b) A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* reveals altered transport as a mechanism of resistance to the anticancer drug bleomycin. *Cancer Res* 64:1102-9.
- Aylon Y., Kupiec M. (2003) The checkpoint protein Rad24 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in processing double-strand break ends and in recombination partner choice. *Mol Cell Biol* 23:6585-96.
- Aylon Y., Kupiec M. (2004) DSB repair: the yeast paradigm. *DNA Repair (Amst)* 3:797-815. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.04.013S1568786404001442 [pii].
- Baldo V., Liang J., Wang G., Zhou H. (2012) Preserving Yeast Genetic Heritage through DNA Damage Checkpoint Regulation and Telomere Maintenance. *Biomolecules* 2:505-523.
- Bashkurov V.I., King J.S., Bashkurova E.V., Schmuckli-Maurer J., Heyer W.D. (2000) DNA repair protein Rad55 is a terminal substrate of the DNA damage checkpoints. *Mol Cell Biol* 20:4393-404.
- Baur M. (1990) *Analyse der Rolle von Glutathion bei der Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrueche mit Hilfe der Puls-Feld-Gelelektrophorese in Hefe*, L-Maximilians University, Munich.
- Bessho T., Sancar A. (2000) Human DNA damage checkpoint protein hRAD9 is a 3' to 5' exonuclease. *J Biol Chem* 275:7451-4.
- Bootsma D., Hoeijmakers J.H. (1994) The molecular basis of nucleotide excision repair syndromes. *Mutat Res* 307:15-23. DOI: 0027-5107(94)90273-9 [pii].
- Bootsma D., Weeda G., Vermeulen W., van Vuuren H., Troelstra C., van der Spek P., Hoeijmakers J. (1995) Nucleotide excision repair syndromes: molecular basis and clinical symptoms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 347:75-81. DOI: 10.1098/rstb.1995.0012.

- Bracesco N., Dell M., Rocha A., Behtash S., Menini T., Gugliucci A., Nunes E. (2003) Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. *J Altern Complement Med* 9:379-87. DOI: 10.1089/107555303765551606.
- Bracesco N., Candreva E.C., Keszenman D., Sanchez A.G., Soria S., Dell M., Siede W., Nunes E. (2007) Roles of *Saccharomyces cerevisiae* RAD17 and CHK1 checkpoint genes in the repair of double-strand breaks in cycling cells. *Radiat Environ Biophys* 46:401-7. DOI: 10.1007/s00411-007-0119-y.
- Bracesco N., Blanc L., Candreva E., Contreras V., Sosa V., Sánchez A., Hocart S., Ferder L., Salvo V., Nunes E. (2013) Protection Against Ionizing Radiation by *Ilex paraguariensis* Infusion and Its Polyphenolic Component Rutin in Cell Populations of *Saccharomyces cerevisiae*.
- Branzei D., Foiani M. (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:297-308. DOI: nrm2351 [pii]10.1038/nrm2351.
- Candreva E., Keszenman D.J., Bracesco N., Soria S., Sánchez A.G., Dell M., Siede W., Nunes E. (2004) A role of *S. cerevisiae* checkpoint protein Rad17 but not Chk1 in the repair of bleomycin-induced double-strand breaks in cycling and non-cycling cells., ASM conferences, Southampton.
- Ciccia A., Elledge S.J. (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40:179-204. DOI: S1097-2765(10)00747-1 [pii]10.1016/j.molcel.2010.09.019.
- Cimprich K.A., Cortez D. (2008) ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:616-27. DOI: nrm2450 [pii]10.1038/nrm2450.
- Cole G.M., Schild D., Lovett S.T., Mortimer R.K. (1987) Regulation of RAD54- and RAD52-lacZ gene fusions in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 7:1078-84.
- Chen J., Stubbe J. (2004) Bleomycins: new methods will allow reinvestigation of old issues. *Curr Opin Chem Biol* 8:175-81. DOI: 10.1016/j.cbpa.2004.02.008S1367593104000237 [pii].
- Chen J., Stubbe J. (2005) Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer* 5:102-12. DOI: nrc1547 [pii]10.1038/nrc1547.
- Daley J.M., Palmboos P.L., Wu D., Wilson T.E. (2005) Nonhomologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet* 39:431-51. DOI: 10.1146/annurev.genet.39.073003.113340.
- de Boer J., Hoeijmakers J.H. (2000) Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21:453-60.
- Downs J.A., Nussenzweig M.C., Nussenzweig A. (2007) Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature* 447:951-8. DOI: nature05980 [pii]10.1038/nature05980.
- Eckardt F., Haynes R.H. (1977) Kinetics of mutation induction by ultraviolet light in excision-deficient yeast. *Genetics* 85:225-47.
- Elledge S.J. (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274:1664-72.

- Errol C. Friedberg M., Graham C. Walker P., Wolfram Siede P., Richard D. Wood P., Roger A. Schultz P., Tom Ellenberger P., DVM. (2006) DNA REPAIR AND MUTAGENESIS. 2nd ed. ASM Press.
- Foury F. (1997) Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene* 195:1-10. DOI: S0378-1119(97)00140-6 [pii].
- Franklin T.J., Snow G.A. (2005) *Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action* Springer Science+Business Media, Incorporated.
- Freire R., Murguia J.R., Tarsounas M., Lowndes N.F., Moens P.B., Jackson S.P. (1998) Human and mouse homologs of *Schizosaccharomyces pombe* rad1(+) and *Saccharomyces cerevisiae* RAD17: linkage to checkpoint control and mammalian meiosis. *Genes Dev* 12:2560-73.
- Friedberg E.C. (2001) How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 1:22-33. DOI: 10.1038/35094000.
- Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W. (1995) *DNA Repair and Mutagenesis* American Society for Microbiology
- Friedl A.A., Kiechle M., Fellerhoff B., Eckardt-Schupp F. (1998) Radiation-induced chromosome aberrations in *Saccharomyces cerevisiae*: influence of DNA repair pathways. *Genetics* 148:975-88.
- Gardiner K. (1990) Pulsed field gel electrophoresis and investigations into mammalian genome organization. *J Cell Sci* 96 ( Pt 1):5-8.
- Gardiner K. (1991) Pulsed field gel electrophoresis. *Anal Chem* 63:658-65.
- Gardiner K., Patterson D. (1989) Transverse alternating field electrophoresis and applications to mammalian genome mapping. *Electrophoresis* 10:296-302. DOI: 10.1002/elps.1150100505.
- Geigl E.M., Eckardt-Schupp F. (1991) The repair of double-strand breaks and S1 nuclease-sensitive sites can be monitored chromosome-specifically in *Saccharomyces cerevisiae* using pulse-field gel electrophoresis. *Mol Microbiol* 5:1615-20.
- Gerlinger U.M., Guckel R., Hoffmann M., Wolf D.H., Hilt W. (1997) Yeast cycloheximide-resistant *crl* mutants are proteasome mutants defective in protein degradation. *Mol Biol Cell* 8:2487-99.
- Hartwell L.H. (1974) *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol Rev* 38:164-98.
- Hartwell L.H., Weinert T.A. (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246:629-34.
- Haynes R.H., Eckardt F., Kunz B.A. (1985) Analysis of non-linearities in mutation frequency curves. *Mutat Res* 150:51-9.
- Herskowitz I. (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 52:536-53.
- Jackson S.P. (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23:687-96.
- Jentsch S., McGrath J.P., Varshavsky A. (1987) The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature* 329:131-4. DOI: 10.1038/329131a0.
- Kai M. (2013) Role of the Checkpoint Clamp in DNA Damage Response. *Biomolecules* 3:75-84.

- Kaidi A., Weinert B.T., Choudhary C., Jackson S.P. (2010) Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation. *Science* 329:1348-53. DOI: 329/5997/1348 [pii]10.1126/science.1192049.
- Keszenman-Pereyra D. (1990) Repair of UV-damaged incoming plasmid DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Photochem Photobiol* 51:331-42.
- Keszenman D.J. (2002) Mecanismos de reparación de ADN inducibles por bleomicina y choque térmico en *Saccharomyces cerevisiae*., PEDECIBA, Facultad de Medicina, Montevideo.
- Keszenman D.J., Salvo V.A., Nunes E. (1992) Effects of bleomycin on growth kinetics and survival of *Saccharomyces cerevisiae*: a model of repair pathways. *J Bacteriol* 174:3125-32.
- Keszenman D.J., Candreva E.C., Nunes E. (1996) Cycloheximide interacts with bleomycin induced oxidative stress. *Environ Mol Mutagenesis* 27:35-35.
- Keszenman D.J., Carmen Candreva E., Nunes E. (2000) Cellular and molecular effects of bleomycin are modulated by heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 459:29-41. DOI: S0921877799000567 [pii].
- Keszenman D.J., Candreva E.C., Sanchez A.G., Nunes E. (2005) RAD6 gene is involved in heat shock induction of bleomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Mol Mutagen* 45:36-43. DOI: 10.1002/em.20083.
- Kondo T., Matsumoto K., Sugimoto K. (1999) Role of a complex containing Rad17, Mec3, and Ddc1 in the yeast DNA damage checkpoint pathway. *Mol Cell Biol* 19:1136-43.
- Letavayova L., Markova E., Hermanska K., Vlckova V., Vlasakova D., Chovanec M., Brozmanova J. (2006) Relative contribution of homologous recombination and non-homologous end-joining to DNA double-strand break repair after oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* 5:602-10. DOI: S1568-7864(06)00023-1 [pii]10.1016/j.dnarep.2006.01.004.
- Lillo O., Bracesco N., Nunes E. (2011) Lethal and mutagenic interactions between gamma-rays, cisplatin and etoposide at the cellular and molecular levels. *Int J Radiat Biol* 87:222-30. DOI: 10.3109/09553002.2010.518207.
- Lillo O.L., Severgnini A.A., Nunes E.M. (1997) Interactive lethal and mutagenic effects of ultraviolet light and bleomycin in yeast: synergism or antagonism? *Radiat Res* 148:476-80.
- Lim S.T., Jue C.K., Moore C.W., Lipke P.N. (1995) Oxidative cell wall damage mediated by bleomycin-Fe(II) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 177:3534-9.
- Lowndes N.F., Murguia J.R. (2000) Sensing and responding to DNA damage. *Current Opinion in Genetics & Development* 10:17-25. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-437X\(99\)00050-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-437X(99)00050-7).
- Lydall D., Weinert T. (1995) Yeast checkpoint genes in DNA damage processing: implications for repair and arrest. *Science* 270:1488-91.
- Lydall D., Whitehall S. (2005) Chromatin and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 4:1195-207. DOI: S1568-7864(05)00143-6 [pii]10.1016/j.dnarep.2005.06.007.

- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J., Fernández M.G., Pérez M.S. (2003) *Biología de los microorganismos*: Brock Pearson, Préntice Hall.
- Majka J., Burgers P.M. (2003) Yeast Rad17/Mec3/Ddc1: a sliding clamp for the DNA damage checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2249-54. DOI: 10.1073/pnas.0437148100 0437148100 [pii].
- Majka J., Burgers P.M. (2005) Function of Rad17/Mec3/Ddc1 and its partial complexes in the DNA damage checkpoint. *DNA Repair (Amst)* 4:1189-94. DOI: S1568-7864(05)00199-0 [pii]10.1016/j.dnarep.2005.07.008.
- McCusker J.H., Haber J.E. (1988) Cycloheximide-resistant temperature-sensitive lethal mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 119:303-15.
- McGowan C.H., Russell P. (2004) The DNA damage response: sensing and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 16:629-33. DOI: S0955-0674(04)00141-3 [pii]10.1016/j.ceb.2004.09.005.
- Melo J.A., Cohen J., Toczyski D.P. (2001) Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes Dev* 15:2809-21. DOI: 10.1101/gad.903501.
- Mills K.D., Sinclair D.A., Guarente L. (1999) MEC1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks. *Cell* 97:609-20. DOI: S0092-8674(00)80772-2 [pii].
- Moore C.W. (1978) Bleomycin-induced mutation and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 58:41-9.
- Moore C.W., McKoy J., Dardalhon M., Davermann D., Martinez M., Averbeck D. (2000) DNA damage-inducible and RAD52-independent repair of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 154:1085-99.
- Morgan D. (2007) *The Cell Cycle: Principles of Control* OUP/New Science Press.
- Murakami-Sekimata A., Huang D., Piening B.D., Bangur C., Paulovich A.G. (2010) The *Saccharomyces cerevisiae* RAD9, RAD17 and RAD24 genes are required for suppression of mutagenic post-replicative repair during chronic DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 9:824-34. DOI: S1568-7864(10)00135-7 [pii]10.1016/j.dnarep.2010.04.007.
- Murray A.W. (1992) Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* 359:599-604. DOI: 10.1038/359599a0.
- Novarina D., Amara F., Lazzaro F., Plevani P., Muzi-Falconi M. (2011) Mind the gap: keeping UV lesions in check. *DNA Repair (Amst)* 10:751-9. DOI: S1568-7864(11)00127-3 [pii]10.1016/j.dnarep.2011.04.030.
- Nunes E., Pohlit W. (1968a) Wirkung von Röntgenstrahlung auf stationäre und sich exponentiell vermehrende haploide Hefepopulationen. *Radiation and Environmental Biophysics* 4:320-328.
- Nunes E., Pohlit W. (1968b) Einzelzellbeobachtungen von roentgenbestrahlten haploiden Hefezellen. *Radiation and Environmental Biophysics* 4:329-342.
- Nunes E., Gelós U. (2006) Proliferación celular y su perturbación. Aspectos cuantitativos y moleculares. FEFMUR.
- Nunes E., Lorigo L., Gelos U. (1975) Survival of synchronized diploid yeast after ultraviolet irradiation. *Radiat Res* 63:474-82.

- Nunes E., Candreva E., Bracesco N., Sanchez A., Dell M. (2008) HDF1 and RAD17 genes are involved in DNA double-strand break repair in stationary phase *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Phys* 34:63-71. DOI: 10.1007/s10867-008-9105-0.
- Nyberg K.A., Michelson R.J., Putnam C.W., Weinert T.A. (2002) Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* 36:617-56. DOI: 10.1146/annurev.genet.36.060402.113540060402.113540 [pii].
- Panasci L.C., Aloyz R., Alaoui-Jamali M.A. (2013) *Advances in DNA Repair in Cancer Therapy* Springer.
- Paques F., Haber J.E. (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:349-404.
- Parrilla-Castellar E.R., Arlander S.J., Karnitz L. (2004) Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA Repair (Amst)* 3:1009-14. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.03.032S1568786404001041 [pii].
- Paulovich A.G., Toczyski D.P., Hartwell L.H. (1997) When checkpoints fail. *Cell* 88:315-21. DOI: S0092-8674(00)81870-X [pii].
- Polo S.E., Jackson S.P. (2011) Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev* 25:409-33. DOI: 25/5/409 [pii]10.1101/gad.2021311.
- Prado F., Cortes-Ledesma F., Huertas P., Aguilera A. (2003) Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 42:185-98. DOI: 10.1007/s00294-002-0346-3.
- Pron G., Belehradek J., Jr., Mir L.M. (1993) Identification of a plasma membrane protein that specifically binds bleomycin. *Biochem Biophys Res Commun* 194:333-7. DOI: S0006-291X(83)71824-3 [pii]10.1006/bbrc.1993.1824.
- Ramotar D., Wang H. (2003) Protective mechanisms against the antitumor agent bleomycin: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 43:213-24. DOI: 10.1007/s00294-003-0396-1.
- Ronen A., Glickman B.W. (2001) Human DNA repair genes. *Environ Mol Mutagen* 37:241-83. DOI: 10.1002/em.1033 [pii].
- Rose M.D., Winston F., Hieter P. (1990) *Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor, NY.
- Sancar A. (1996) DNA excision repair. *Annu Rev Biochem* 65:43-81. DOI: 10.1146/annurev.bi.65.070196.000355.
- Schneider-Poetsch T., Ju J., Eyler D.E., Dang Y., Bhat S., Merrick W.C., Green R., Shen B., Liu J.O. (2010) Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol* 6:209-217. DOI: nchembio.304 [pii] 10.1038/nchembio.304.
- Schwartz D.C., Cantor C.R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37:67-75. DOI: 0092-8674(84)90301-5 [pii].
- Shin D.S., Chahwan C., Huffman J.L., Tainer J.A. (2004) Structure and function of the double-strand break repair machinery. *DNA Repair (Amst)* 3:863-73. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.03.022S1568786404000813 [pii].

- Siede W. (1995) Cell cycle arrest in response to DNA damage: lessons from yeast. *Mutat Res* 337:73-84.
- Siede W., Eckardt F., Brendel M. (1983) Analysis of mutagenic DNA repair in a thermoconditional repair mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. II. Influence of cycloheximide on UV-irradiated exponentially growing rev2ts cells. *Mol Gen Genet* 190:413-6.
- Siede W., Nusspaumer G., Portillo V., Rodriguez R., Friedberg E.C. (1996) Cloning and characterization of RAD17, a gene controlling cell cycle responses to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 24:1669-75. DOI: 6a0046 [pii].
- Symington L.S., Heyer W.-D. (2006) Some disassembly required: role of DNA translocases in the disruption of recombination intermediates and dead-end complexes. *Genes & Development* 20:2479-2486. DOI: 10.1101/gad.1477106.
- Tsukamoto Y., Kato J., Ikeda H. (1996) Hdf1, a yeast Ku-protein homologue, is involved in illegitimate recombination, but not in homologous recombination. *Nucleic Acids Res* 24:2067-72. DOI: 6c0031 [pii].
- Ulrich H.D. (2002) Degradation or maintenance: actions of the ubiquitin system on eukaryotic chromatin. *Eukaryot Cell* 1:1-10.
- Umezawa H. (1976) Structure and action of bleomycin. *Prog Biochem Pharmacol* 11:18-27.
- Umezawa H., Maeda K., Takeuchi T., Okami Y. (1966) New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot (Tokyo)* 19:200-9.
- Umezawa H., Takita T., Sugiura Y., Otsuka M., Kobayashi S., Ohno M. (1984) DNA-bleomycin interaction: Nucleotide sequence-specific binding and cleavage of DNA by bleomycin. *Tetrahedron* 40:501-509. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020\(84\)85055-3](http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020(84)85055-3).
- Walker G.M. (1998) *Yeast Physiology and Biotechnology* Wiley.
- Wan G., Mathur R., Hu X., Zhang X., Lu X. (2011) miRNA response to DNA damage. *Trends Biochem Sci* 36:478-84. DOI: S0968-0004(11)00085-5 [pii]10.1016/j.tibs.2011.06.002.
- Watson J.D. (2006) *Biología molecular de gen Editorial Médica Panamericana*.
- Zhang H., Zhu Z., Vidanes G., Mbangkollo D., Liu Y., Siede W. (2001) Characterization of DNA damage-stimulated self-interaction of *Saccharomyces cerevisiae* checkpoint protein Rad17p. *J Biol Chem* 276:26715-23. DOI: 10.1074/jbc.M103682200M103682200 [pii].
- Zhou B.B., Elledge S.J. (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408:433-9. DOI: 10.1038/35044005.
- Zhu Z., Chung W.H., Shim E.Y., Lee S.E., Ira G. (2008) Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* 134:981-94. DOI: S0092-8674(08)01118-5 [pii]10.1016/j.cell.2008.08.037.