

© 2018 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 21(1): 34-39, 2018.

DOI: 10.1016/j.recqb.2017.08.004

EL CROMO (VI) INDUCE LA FRECUENCIA DE MUTACIÓN Y PÉRDIDA DE HETEROCIGOCIDAD EN *Saccharomyces cerevisiae*

Gustavo Santoyo

Laboratorio de Diversidad Genómica, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Av. Gral. Francisco J. Mujica s/n, C.P. 58030, Morelia, Michoacán, México. E-mail: gsantoyo@umich.mx

RESUMEN

El cromo (Cr) es uno de los principales contaminantes en desechos industriales, asociado con diversos daños a la salud humana, motivo por el que en este trabajo analizamos el efecto del Cr hexavalente sobre la frecuencia de mutación espontánea (utilizando el gen reportero *CAN1*) y la pérdida de heterocigocidad en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se comparó su efecto en una mutante en el gen *rev3*, que codifica para la polimerasa zeta. Los resultados sugieren que el Cr(VI) puede inducir la frecuencia de mutación entre 20 y 28 veces, a concentraciones de 25 y 50 mM, respectivamente e incrementarse en una mutante *rev3* y aunque no se observaron los mismos niveles como en la cepa silvestre, esto sugiere que, además de *rev3*, existen otros factores que inducen la aparición de mutaciones en el marcador empleado. El Cr también tuvo un efecto al aumentar la pérdida de heterocigocidad de entre 50 y 57 veces en la cepa silvestre y la mutante *rev3*, respectivamente. Estos resultados muestran que *REV3* participa en el efecto mutagénico causado por el Cr(VI), pero no en la pérdida de heterocigocidad, en las células de la levadura.

Palabras Clave: cromo hexavalente, frecuencia de mutación, levadura.

Chromium (VI) induces the mutation frequency and loss of heterozygosity in *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

Chromium (Cr) is one of the main pollutants in industrial waste, so it has been associated with various damages to human health. Therefore, in this work we analyze the effect of the hexavalent Cr on the frequency of spontaneous mutation (by using the forward mutation reporter *CAN1*) and the loss of heterozygosity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and in a mutant in the *rev3* gene, which codes for the zeta polymerase. The results suggest that Cr (VI) can induce mutation frequency between 20 and 28-fold, at concentrations of 25 and 50 mM, respectively. This mutation frequency also increased in a *rev3* mutant, although the same levels were not observed as in the wild strain, suggesting that in addition to *rev3*, there are other factors also participate during mutation induction in *CAN1* marker. Cr also had an effect by increasing the heterozygosity loss of between 50 and 57-fold in the wild-type strain and the *rev3* mutant, respectively. These results show that *REV3* participates in the mutagenic effect caused Cr (VI), but not in the loss of heterozygosity, in yeast cells.

Key Words: hexavalent chromium, mutation frequency, yeast.

INTRODUCCIÓN

El cromo es un elemento que principalmente existe en dos estados, hexavalente Cr(VI) y trivalente Cr(III) (O'Brien *et al.*, 2003). El Cr(VI) es comúnmente originado de los desperdicios y contaminantes industriales, siendo por ésta causa importante de preocupación por la salud humana, ya que se ha asociado con diversos tipos de cáncer (O'Brien *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2005). En la naturaleza, su forma Cr(III) es la más común. Desde hace tiempo, se ha documentado que el Cr(VI) tiene la capacidad de penetrar las membranas celulares a través de transportadores de iones de sulfato. Una vez que el Cr(VI) entra en la célula, es reducido a Cr(III), su forma más estable (Cervantes *et al.*, 2001). El Cr(III) es un componente que puede dañar al DNA y de igual manera, algunas otras formas intermediarias que son consecuencia de la reducción del Cr(VI) como por ejemplo: los radicales libres (Harris & Shi, 2003), el daño que causan los intermediarios al DNA son: cortes en cadena sencilla o doble, pérdida de bases y deleciones cromosomales, entre otros. Las consecuencias biológicas de estos daños pueden ser la aparición de mutaciones, rearrreglos en el genoma y hasta inducir la muerte celular (O'Brien *et al.*, 2002).

Las células han desarrollado sistemas que les permiten enfrentar y reparar daños al DNA (Aylon & Kupiec, 2004) como son: los eventos de recombinación homóloga, recombinación no homóloga y otros sistemas como la remoción de bases (Dudasova *et al.*, 2004; Krogh & Symington, 2004). En algunos casos la reparación no es tan eficiente, pero en otros si el DNA ha sido dañado y no es removido antes de la replicación, polimerasas de baja fidelidad, también conocidas como mutasas (*REV3*), pueden sintetizar nuevas cadenas de DNA y ayudar a corregir el daño (Holbeck & Strathern, 1997; Rattray *et al.*, 2001; Rattray *et al.*, 2002), incluso durante la recombinación homóloga, aunque esto conlleva a la aparición de mutaciones. De hecho se ha asociado la reparación de cortes en doble cadena con el papel del *REV3*, así como su alto efecto mutagénico asociado a la recombinación (Holbeck & Strathern, 1997; Rattray *et al.*, 2001; Rattray *et al.*, 2002). El gen *REV3* codifica para la subunidad catalítica de la polimerasa zeta de baja fidelidad (Rattray & Strathern, 2003). Este DNA polimerasa es requerido durante la mutagénesis inducida por rayos UV. La polimerasa zeta no es esencial para el crecimiento celular y tiene la capacidad de sintetizar a través de dímeros de timina, que es importante para la sobrevivencia celular cuando existen dosis de radiación UV (Nelson *et al.*, 1996).

La pérdida de heterocigocidad es un evento en el cual se pierde la única copia de algún alelo. Este tipo de eventos son importantes, ya que se ha asociado con la pérdida de genes supresores de tumores debido a los eventos mencionados (Nestor *et al.*, 2007). Existen varios mecanismos por los cuales puede haber pérdida de heterocigocidad, entre ellos por conversión génica, deleciones, recombinación mitótica y pérdida cromosomal (Donahue *et al.*, 2006; Santoyo & Romero, 2005).

En el presente estudio examinamos el efecto del Cr(VI) sobre la frecuencia de mutación y la pérdida de heterocigocidad en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, así como en una mutante *rev3*. Para esto utilizamos una cepa que contiene el gen *CANI*, que codifica para una permeasa de arginina (Rattray *et al.*, 2015). Este gen, en presencia del compuesto canavanina (análogo a la arginina) es letal para la célula. Por lo tanto, es útil para determinar la frecuencia de mutación. Las mutaciones que pueden surgir pueden ser diversas, incluyendo inserciones o deleciones puntuales o de varios nucleótidos que cambian el marco de lectura del gen. Sin embargo, la selección de colonias resistentes a la canavanina se pueden dar también por deleciones parciales del marcador o de mayor tamaño (cromosomales) que incluyan la pérdida del gen *CANI*. Para esto, se insertó adyacente al alelo *CANI* el alelo *HIS3*. Por lo que seleccionando colonias resistentes a la canavanina y protótrofos de histidina podemos seleccionar mutantes *can1* espontáneas y aquellas inducidas por elementos mutagénicos, como el cromo (Amberg *et al.*, 2005; Santoyo & Strathern, 2008). Mediante la selección de colonias resistentes a la canavanina en presencia de histidina, la gran mayoría de los eventos estarán relacionados con la pérdida de heterocigocidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de levadura

Los genotipos de las cepas de levadura que se utilizaron en este trabajo son: YJM1 *MATa-inc can1-Δ17 cyh2^{RR} his3-Δ200 leu2-Δ1 lys::ΔhisG trp-Δ1 ura3-52 tyr 7-1 bud52::CAN1 HIS3*. La cepa YJM1 fue mutada en el alelo *REV3*, generando la cepa YJM2. Su genotipo es el siguiente: *MATa-inc can1-Δ17 cyh2^{RR} his3-Δ200 leu2-Δ1 lys::ΔhisG trp-Δ1 ura3-52 tyr 7-1 bud52::CAN1 HIS3 rev3::LEU2*. Las cepas fueron amablemente donadas por A. Rattray y J. Strathern del CCR-NIH, USA. Ambas cepas fueron construidas y descritas en un trabajo anterior (Rattray *et al.*, 2015). Brevemente, la secuencia del marcador *CANI* presente en el casete va de la posición -148 a + 1973 en relación con el codón de inicio del marcador (*CANI*). La cepa también alberga una deleción de 1844 pb del gen *CANI*, la cual va de -151 a + 1995 con respecto al codón de inicio (ATG). La inserción de *HIS3* (adyacente a *CANI*) incluye secuencias de -191 a + 857 con respecto del marco de lectura abierto de *HIS3*. Finalmente, el tamaño total del casete *CANIHIS3* es de 3.8 Kb. Un esquema del sistema se muestra en la Figura 1.

Químicos utilizados

Se utilizó cromo hexavalente (CrO₃, adquirido de Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI) preparado en agua estéril, destilada y desionizada antes de cada experimento.

Análisis de sobrevivencia, pérdida de heterocigocidad y mutación

Los cultivos de levadura fueron crecidos hasta la fase logarítmica en medio YPD (Amberg *et al.*, 2005) cuando se les agregaron las concentraciones indicadas de Cr(VI) por 2 horas a 30⁰ C en agitación constante (250 rpm). Después de este tratamiento,

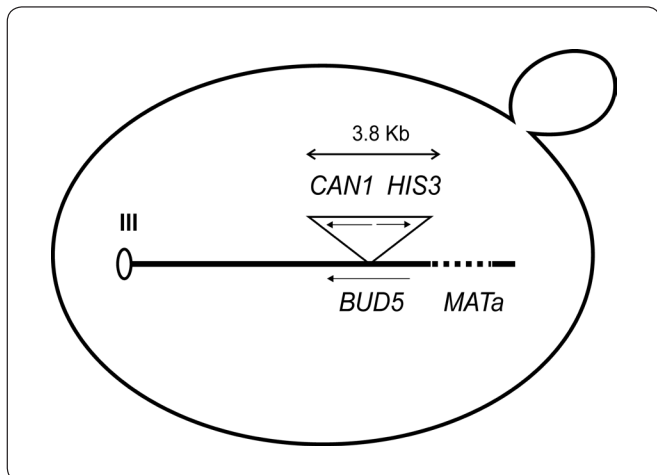


Figura 1. Esquema del sistema para detectar la frecuencia de mutación y pérdida de heterocigocidad en *Saccharomyces cerevisiae*. El marcador *CAN1* codifica para una permeasa de arginina, por lo que la resistencia a canavanina (un análogo de arginina), la cual es tóxica para la levadura, sucede cuando se generan mutaciones que anulan la función del gen. El gen *HIS3* se emplea para evitar la delección de *CAN1* al analizar la frecuencia de mutación, pero no en la pérdida de heterocigocidad. Este sistema se ha empleado anteriormente (Ratray *et al.*, 2015).

los cultivos fueron centrifugados y lavados dos veces con PBS. El concentrado celular fue entonces resuspendido en agua estéril y se realizaron diluciones seriadas. Posteriormente se plaquearon en cajas con medio YPD, AA+canavanina-arginina y AA+canavanina-arginina-histidina (Amberg *et al.*, 2005). El crecimiento celular fue determinado después de 3-4 días de incubación a 30°C. La frecuencia de mutación se determinó por el porcentaje de sobrevivencia en cajas AA+canavanina-arginina-histidina. Para la frecuencia en la pérdida de heterocigocidad, se determinó por el número de colonias crecidas en medio AA+canavanina-arginina. Cabe destacar que al eliminar la histidina del medio, el 90% de las clonas mutantes mostraron la pérdida total del marcador (Resultados no mostrados). Otros posibles eventos como conversiones, no fueron analizadas. El porcentaje de sobrevivencia, mutación espontánea y pérdida de heterocigocidad fue determinado con respecto al experimento control que careció de Cr(VI).

Análisis estadístico

Se realizaron las pruebas *t* de Student ($P < 0.05$) para determinar las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con la ayuda del siguiente sitio en la red: www.physics.csbsju.edu/stats/t-test.html.

RESULTADOS

Análisis de sobrevivencia

Las cepas YJM1 y YJM2, esta última mutada en el gen *rev3*, fueron analizadas mediante experimentos de sobrevivencia en

presencia o no de cromo hexavalente. La curva de sobrevivencia que se observa para ambas cepas muestra una disminución dependiente de la dosis aplicada y una sobrevivencia similar en medios carentes de cromo. al adicionar el elemento hasta concentraciones de 50mM, la curva es nuevamente similar entre ambas cepas, la silvestre y la mutante *rev3* (Figura 2). Para la cepa silvestre, a concentraciones de 50mM de cromo su sobrevivencia se afectó en un 20%, mientras que para la mutante *rev3* se observó una disminución del 30%. Sin embargo, la diferencia entre los valores de ambas cepas no son significativos ($P < 0.05$). Estos resultados sugieren que la mutación en el gen *rev3*, el cual codifica para la polimerasa zeta, no juega un papel importante para contrarrestar los efectos tóxicos del cromo hexavalente.

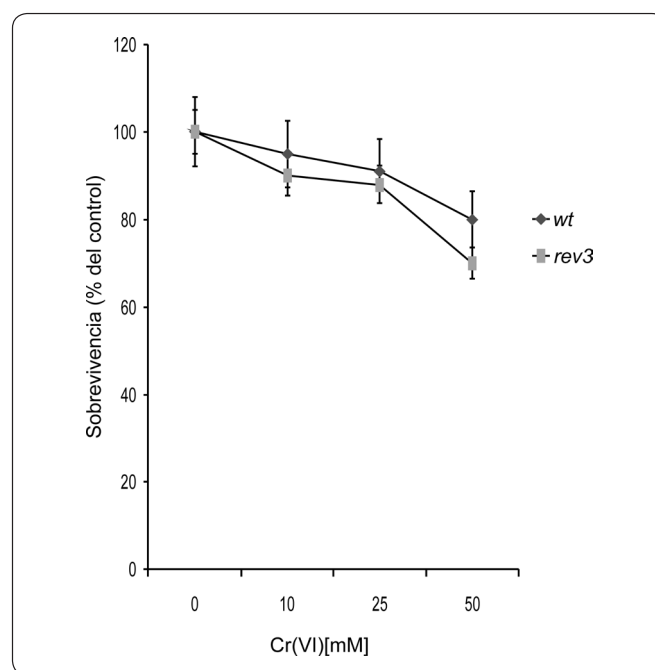


Figura 2. Curvas de sobrevivencia de las cepas YJM1 y YJM2 (mutante *rev3*) en diferentes concentraciones de cromo hexavalente.

Análisis de mutación en el gen *CAN1* inducida por Cr(VI)

Anteriormente se habían reportado las tasas de mutación espontánea para el gen *CAN1* de esta misma cepa (Ratray *et al.*, 2015). Sin embargo, en este trabajo decidimos conocer si el cromo podría tener un efecto sobre la frecuencia de mutación, así como el papel que está jugando la polimerasa *REV3*. En la figura 3 se muestra un incremento en la frecuencia de mutación para la cepa silvestre, la cual es dependiente de la concentración del cromo. A concentraciones de 25 y 50 mM de cromo, se observó un incremento en la mutación de 20 y 28 veces, respectivamente. Estas frecuencias inducidas por cromo son significativamente diferentes con respecto a los experimentos controles, que carecen de la presencia del metal ($P < 0.05$).

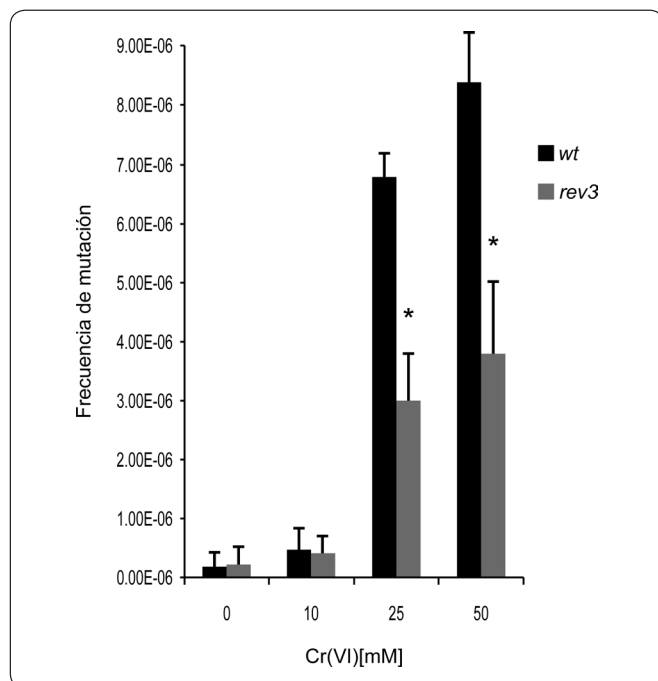


Figura 3. Frecuencia de mutación de las cepas YJM1 y YJM2 (mutante *rev3*) crecidas en diferentes concentraciones de cromo hexavalente.

Para la mutante *rev3*, no se observó una disminución en la frecuencia de mutación inducida por cromo (Figura 3). Por el contrario, la frecuencia se incrementó en niveles similares a la cepa silvestre. En presencia del metal las concentraciones de 25 y 50 mM, se notó un incremento en la mutación del marcador *CANI* de 18 y 20 veces, respectivamente. Esto sugiere que la presencia de cromo está teniendo un efecto importante sobre la frecuencia de mutación en ambas cepas. Así mismo, el efecto del Cr en una mutante *rev3* sigue incrementando la frecuencia de mutación, aunque fueron significativamente menores las frecuencias comparadas con aquellas ocurridas en la cepa silvestre (2.2 veces para ambas concentraciones de 25 y 50 mM de Cr). Lo anterior sugiere que aproximadamente la mitad de las mutaciones se deben al afecto de *REV3*.

Efecto del cromo en la pérdida de heterociguidad

El cromo puede dañar de varias maneras el DNA de los organismos por lo tanto, decidimos conocer si el elemento tenía un efecto sobre la pérdida de heterociguidad del marcador *CANI* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Como se muestra en la Figura 4, la presencia del cromo hexavalente induce la pérdida de heterociguidad de una manera dependiente de la dosis en la cepa silvestre y *rev3*. A concentraciones tan bajas como 10 mM, el cromo induce la pérdida de heterociguidad 22 veces más alto en la cepa silvestre. En concentraciones mayores del metal (50 mM), la frecuencia fue de hasta 55 veces. En la mutante *rev3*, se observó una inducción similar a la cepa silvestre a concentraciones de 50 mM de hasta 57 veces. Estos valores son

significativos respecto a los experimentos control sin adicionar cromo ($P < 0.05$). Por consiguiente, los resultados muestran que el cromo está teniendo un efecto significativo en la pérdida de heterociguidad para el marcador *CANI* en la levadura.

DISCUSIÓN

El cromo es un metal que en altas concentraciones puede incidir en la salud humana de manera dañina (O'Brien *et al.*, 2003; Cervantes *et al.*, 2001). De hecho, se ha reportado y reconocido como un potente carcinógeno (O'Brien *et al.*, 2003; O'Brien *et al.*, 2002). El espectro de daños que puede causar este metal es muy amplio. Por ejemplo, una traducción inexacta del RNA mensajero y como consecuencia un incremento en los agregados proteicos, siendo tóxico para la célula (Holland *et al.*, 2007). Adicionalmente, en el DNA puede causar cortes en cadena sencilla, cortes en doble cadena, inserciones, deleciones, así como entrecruzamientos DNA-proteína. Se sabe que durante la reducción del cromo hexavalente, se producen radicales libres y productos del oxígeno, los cuales pueden dañar de manera directa al DNA (O'Brien *et al.*, 2003). En este trabajo reportamos que el cromo puede inducir de manera importante la frecuencia de mutación y esto hace posible que a través de la producción de subproductos, como los radicales libres, se produzcan mutaciones (Harris & Shi, 2003; Santoyo & Strathern, 2008), aunque no se descartan otros mecanismos de toxicidad del Cr (Holland *et al.*, 2007). Anteriormente, habíamos reportado el espectro de mutaciones espontáneas para el marcador *CANI* (Ratray *et al.*, 2015). Sería importante conocer en un futuro, si el espectro de mutaciones inducidas por cromo es diferente a las inducidas espontáneamente. Resultados preliminares muestran que probablemente el cromo induce deleciones en *CANI* de más de 100 pares de bases, ya que al amplificar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa el marcador *can1* de diferentes cepas resistentes a canavanina, inducidas por cromo, muestran un patrón de bandas con tamaños diversos, lo que sugiere que la generación de deleciones es de tamaño variable. La pérdida de heterociguidad es un importante mecanismo que se ha asociado con la pérdida de genes que son importantes para suprimir tumores (Muzumdar *et al.*, 2016; Nestor *et al.*, 2007). Los mecanismos para que se den este tipo de eventos son variados, como la conversión génica, recombinación, deleciones que incluyen desde unos cuantos pares de bases perdidas hasta la pérdida de cromosomas enteros (Donahue *et al.*, 2006). Así, el tamaño de las deleciones en el DNA para que exista un evento de pérdida de heterociguidad puede variar.

Desde hace algunos años se ha demostrado que el cromo induce cortes en doble cadena en el DNA de células de mamífero (Rothkamm *et al.*, 2003), que puede desencadenar en una pérdida mayor de segmentos de DNA. Así mismo, en un reporte reciente (Kirpnick-Sobol *et al.*, 2006) se mostró que al suplementar con Cr(III) la dieta de ratones, éste induce deleciones en su genoma. De igual manera, el cromo hexavalente indujo deleciones en la levadura (Kirpnick-Sobol *et al.*, 2006).

Para que se dé este mecanismo en nuestro marcador *CANI*, que mide aproximadamente 1,700 pb, la delección del gen debe ser la casi totalidad o mayor que esa longitud. Ésto sugiere que el cromosoma está induciendo la pérdida o delección de segmentos "grandes" de DNA, que abarcarían un tamaño similar o mayor a la longitud del marcador *CANI*.

Los resultados muestran también que la mutante en *rev3* tiene una respuesta similar a la cepa silvestre con respecto a la pérdida de heterocigocidad (Figura 4). El fundamento para analizar si *REV3* podría tener un papel importante en este evento se basa en antecedentes que muestran que cortes en doble cadena, ya sea espontáneos o inducidos por agentes mutágenos como el Cr(VI), se procesan seguidos de una degradación del DNA para generar extremos 3' (Santoyo *et al.*, 2005). El extremo de cadena sencilla 3' necesita buscar una región homóloga para reparar y rellenar el segmento degradado por acción de las polimerasas, como *REV3*. Por lo tanto, si no existe una cadena de DNA homóloga o polimerasas para reparar la ruptura como en nuestro sistema (Figura 1), se podrían generar delecciones y pérdida de heterocigocidad (Sonoda *et al.*, 2003). Sin embargo, cabe destacar que nuestros resultados muestran que no hay una diferencia significativa entre las cepa silvestre y *rev3* con respecto a la frecuencia de pérdida de heterocigocidad inducida por Cr, indicando que *REV3* no juega un papel esencial en el evento.

El origen de las mutaciones puede ser también muy amplio, sin embargo, es conocido que algunas polimerasas, como *rev3*,

son propensas a cometer errores y producir cambios en el DNA (Ratray & Strathern, 2003). Es por ello, que analizamos si el cromosoma tenía un efecto en la función del gen *REV3*, el cual codifica para la polimerasa zeta. Los resultados muestran que la mutante *rev3* no está siendo afectada de manera única por la presencia del cromosoma. Se sabe que la expresión de *REV3* y por lo tanto, la función de la polimerasa zeta es afectada por diversos factores externos, como la radiación ultravioleta (Singhal *et al.*, 1992; Rajpal *et al.*, 2000). Este tipo de radiación afecta directamente la expresión del gen *REV3*, por lo que su función se ve incrementada. Esto ha sido correlacionado con un aumento en la frecuencia de mutación en cepas de levadura donde la expresión del gen *REV3* ha sido inducida por rayos UV (Rajpal *et al.*, 2000). Actualmente estamos realizando experimentos en el laboratorio para saber si el Cr tiene la capacidad de inducir la expresión de *REV3* en la levadura. Sin embargo, este resultado coincide con los publicados por Ratray y colaboradores, donde se observa que las mutaciones en *CANI* son producidas parcialmente por *REV3* (Ratray *et al.*, 2015) y posiblemente el cromosoma origine mutaciones a través de la producción de radicales libres en el marcador empleado en este trabajo, un efecto observado en otros trabajos (Harris & Shi, 2003; Holland *et al.*, 2007). Sería interesante conocer si el Cr tiene una reacción sobre la expresión y/o actividad de otras mutasas (Ratray & Strathern, 2003). En conclusión, los resultados de este trabajo muestran que el Cr hexavalente tiene importantes repercusiones sobre la aparición de mutaciones y pérdida de heterocigocidad, eventos que podrían implicar la pérdida de actividades en genes importantes para la reparación y el funcionamiento celular.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Jeff Strathern y Alison Ratray por las cepas donadas y todo el apoyo durante mi estancia en el CCR-NIH. También, agradezco al CONACYT por el Proyecto No. 169346, así como a la CIC-UMSNH (Proyecto: 2016-2017). Estoy también en deuda con Cristina Prieto y Roberto Díaz por la ayuda en la preparación de las figuras y con los revisores por sus sugerencias.

REFERENCIAS

- Amberg, D.C., Burke, D.J. & Strathern, J.N. (2005). *Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. CSHL Press. Cold Spring Harbor, NY.
- Aylon, Y. & Kupiec, M. (2004). DSB repair: the yeast paradigm. *DNA Repair.*, **3**,797-815. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.04.013
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J.C. & Moreno-Sánchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**,335-347. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00581.x
- Donahue, S.L., Lin, Q., Cao, S., & Ruley, H. E. (2006). Carcinogens induce genome-wide loss of heterozygosity in normal stem cells without persistent chromosomal instability. *P.N.A.S.*, **103**,11642-11646. DOI: 10.1159/000100406

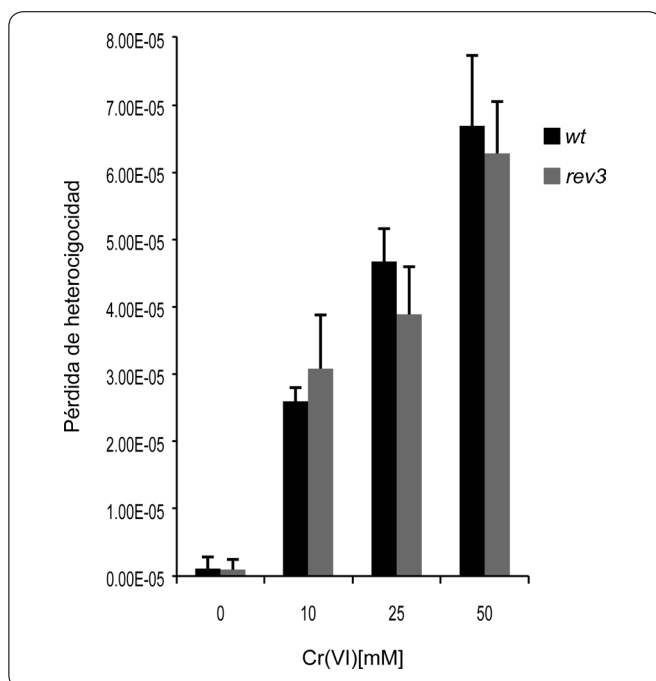


Figura 4. Análisis de la pérdida de heterocigocidad de las cepas YJM1 y YJM2 (mutante *rev3*) crecidas en diferentes concentraciones de cromo hexavalente.

- Dudasova, Z., Dudas, A. & Chovanec, M. (2004). Non-homologous end-joining recombination factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **28**, 581-601 DOI: 10.1016/j.femsre.2004.06.001
- Harris, G.K. & Shi, X. (2003). Signaling by carcinogenic metals and metal-induced reactive oxygen species. *Mutat. Res.*, **533**, 183-200. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2003.08.025
- Holbeck, S.L. & Strathern, J.N. (1997). A role for REV3 in mutagenesis during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **147**, 1017-1024. DOI: <http://www.genetics.org/content/genetics/147/3/1017.full.pdf>
- Holland, S., Lodwig, E., Sideri, T., Reader, T., Clarke, I., Gkargkas, K., Hoyle, D.C., Delneri, D., Oliver S.G., & Avery, S.V. (2007). Application of the comprehensive set of heterozygous yeast deletion mutants to elucidate the molecular basis of cellular chromium toxicity. *Genome Biol.*, **8**, R268. DOI: 10.1186/gb-2007-8-12-r268
- Kirpnick-Sobol, Z., Reliene, R., & Schiestl, R.H. (2006). Carcinogenic Cr (VI) and the nutritional supplement Cr (III) induce DNA deletions in yeast and mice. *Cancer Res.*, **66**, 3480-3484. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3944
- Krogh, B.O. & Symington, L. (2004). Recombination proteins in yeast. *Annu. Rev. Genet.*, **38**, 233-271. DOI: 10.1146/annurev.genet.38.072902.091500
- Muzumdar, M.D., Dorans, K.J., Chung, K.M., Robbins, R., Tammela, T., Gocheva, V. & Jacks, T. (2016). Clonal dynamics following p53 loss of heterozygosity in Kras-driven cancers. *Nature Commun.*, **7**, 12685. DOI: 10.1038/ncomms12685
- Nelson, J. R., Lawrence, C. W., & Hinkle, D. C. (1996). Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. *Science*, **272**, 1646. DOI: 10.1126/science.272.5268.1646
- Nestor, A.L., Holloper, S.L., Matsui, S.I., & Allison, D. (2007). A model for genetic complementation controlling the chromosomal abnormalities and loss of heterozygosity formation in cancer. *Cytogenet. Genome Res.*, **116**, 235-247. <https://doi.org/10.1159/000100406>
- O'Brien, T.J., Ceryak, S. & Patierno, S.R. (2002). Complexities of chromium carcinogenesis: Role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat. Res.*, **533**, 3-36. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2003.09.006
- O'Brien, T.J., Fornaglio, J.L., Ceryak, S. & Patierno, S.R. (2003). Effects of hexavalent chromium on the survival and cell cycle distribution of DNA repair-deficient *S. cerevisiae*. *DNA Repair*, **1**, 617-627. DOI: 10.1016/S1568-7864(02)00078-2
- Rajpal, D. K., Wu, X., & Wang, Z. (2000). Alteration of ultraviolet-induced mutagenesis in yeast through molecular modulation of the *REV3* and *REV7* gene expression. *Mutat. Res.*, **461**, 133-143. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0921-8777\(00\)00047-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0921-8777(00)00047-1)
- Ratray, A., Santoyo, G., Shafer, B. & Strathern, J.N. (2015). Elevated mutation rate during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.*, **11**, e1004910. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004910>
- Ratray, A.J., & Strathern, J.N. (2003). Error-Prone DNA Polymerases: When making a mistake is the only way to get ahead 1. *Annu. Rev. Genet.*, **37**, 31-66. DOI: 10.1146/annurev.genet.37.042203.132748
- Ratray, A.J., McGill, C.B., Shafer, B.K. & Strathern, J.N. (2001). Fidelity of mitotic double-strand-break repair in *Saccharomyces cerevisiae*: a role for *SAE2/COM1*. *Genetics*, **158**, 109-22. DOI: <http://www.genetics.org/content/genetics/158/1/109.full.pdf>
- Ratray, A.J., Shafer, B.K., McGill, C.B. & Strathern, J.N. (2002). The roles of *REV3* and *RAD57* in double-strand-break-repair-induced mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **162**, 1063-1077. DOI: <http://www.genetics.org/content/genetics/162/3/1063.full.pdf>
- Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L.H. & Löbrich, M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 5706-5715. DOI: 10.1128/MCB.23.16.5706-5715.2003
- Santoyo, G. & Strathern, J. N. (2008). Non-homologous end joining is important for repair of Cr (VI)-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Res.*, **163**, 113-119. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2007.09.001>
- Santoyo, G., & Romero, D. (2005). Gene conversion and concerted evolution in bacterial genomes. *FEMS Microbiol. Rev.*, **29**, 169-183. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fmrre.2004.10.004>
- Singhal, R. K., Hinkle, D. C., & Lawrence, C. W. (1992). The *REV3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is transcriptionally regulated more like a repair gene than one encoding a DNA polymerase. *Mol. Gen. Gen.*, **236**, 17-24. DOI: 10.1007/BF00279638
- Sonoda, E., Okada, T., Zhao, G. Y., Tateishi, S., Araki, K., Yamaizumi, M., Yagi, T., Verkaik, N. S., van Gent, D. C., Takata, M., & Takeda, S. (2003). Multiple roles of Rev3, the catalytic subunit of polzeta in maintaining genome stability in vertebrates. *EMBO J.*, **22**, 3188-3197. DOI 10.1093/emboj/cdg308
- Xie, H., Wise, S.S., Holmes, A.L., Xu, B., Wakeman, T.P., Pelsue, S.C., Singh, N.P. & Wise, J.P. (2005). Carcinogenic lead chromate induces DNA double-strand breaks in human lung cells. *Mutat. Res.*, **586**, 160-172. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2005.06.002