

200

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO MUTANTE PSO10-1 DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE. *Nícolas Carlos Hoch, Renato Moreira Rosa, Jenifer Saffi, Joao Antonio Pegas Henriques (orient.) (UFRGS).*

Os mutantes *ps* são linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* caracterizadas pela sensibilidade à fotoadição de psoralenos, causadora de pontes intercadeias no DNA. O mutante *ps10-1* é sensível ao tratamento com 8-metoxipsoraleno fotoativado com UVA, ao 3-carbetoxipsoraleno fototivado, à radiação ultravioleta de alta energia e aos agentes alquilantes metilmetanossulfonato e dietilnitrosamina, e UV-mimético óxido de 4-nitroquinoleína. Com objetivo de clonar e caracterizar molecularmente o gene *PSO10*, a linhagem mutante foi transformada com um banco genômico de *S.cerevisiae* e cerca de 30000 clones foram avaliados quanto a restauração do fenótipo selvagem. Após o isolamento do clone correto, realizou-se experimentos de perda plasmidial e retransformação, que confirmaram o a presença da ORF correspondente ao gene *PSO10*. As ORFs contidas nesse plasmídeo foram clonadas em um vetor de sequenciamento apropriado e o sequenciamento automatizado revelou o gene *MMS21* como alelo de *PSO10*. É conhecido que o produto protético do gene *MMS21* é uma SUMO ligase E3 componente do complexo Smc5-Smc6, semelhante aos complexos condensina e coesina, formados pelas proteínas Smc e elementos não-SMC. Este complexo estaria envolvido na regulação da parada do ciclo celular para fenômenos de reparo, além de provavelmente estabilizar a estrutura do cromossomo para que o dano seja reparado. A partir dessas informações, estão sendo realizados estudos para determinar a influência da mutação *ps10-1* na ligação da proteína Pso10 aos componentes do complexo, pela técnica de interação *in vivo* dois-híbridos, além da visualização de possíveis aberrações na estrutura cromossômica por microscopia de fluorescência e do estudo da progressão do ciclo celular após tratamento com 8-MOP+UVA. Paralelamente, o gene *MMS21* do mutante *ps10-1* foi amplificado pela técnica da reação em cadeia da polimerase e está sendo clonado em um vetor de sequenciamento com fins de análise específica da mutação. (PIBIC).