

Pak1p – Uma possível parceira da Pso2p/Snm1p no reparo de pontes intercadeia no DNA em *Saccharomyces cerevisiae*

Orientador: Prof. Dr. João Antônio Pêgas Henriques

Autores: Fernanda M. Munari, Jacqueline M. Cardone, Luis F. Revers, João A. P. Henriques

Os danos causados na molécula de DNA por agentes indutores de pontes intercadeias (ICLs) constituem um dos piores tipos de lesão genotóxica em eucariotos. Muitos destes agentes possuem aplicações diretas na terapia clínica, especialmente para o tratamento de tumores e patologias da pele, como os psoralenos. O estudo dos mecanismos de reparação de ICLs é de fundamental importância para o desenho de novas drogas antitumorais e para a montagem de protocolos quimioterápicos mais eficientes. Entre os mutantes de *S. cerevisiae* sensíveis a psoralenos, somente os alelos mutantes do gene *PSO2* apresentam sensibilidade específica aos tratamentos com indutores de ICLs, sendo a Pso2p uma das principais famílias protéicas associadas à reparação e/ou tolerância celular a este tipo de dano. As enzimas da via NER iniciam o processamento do DNA contendo a ICL, mas o reparo é bloqueado num passo pós-incisão em mutantes *pso2Δ*. Entretanto, ainda não existem dados empíricos sobre como a Pso2p tem a sua função endonucleásica ativada. Dados obtidos pelo nosso grupo, após um *screening* de potenciais parceiros de ligação à Pso2p utilizando o sistema dois-híbridos em leveduras, demonstraram que a proteína cinase Pak1p interage com o domínio C-terminal β-CASP de Pso2p, uma região conservada entre os ortólogos Pso2p. Adicionalmente, ensaios de fosforilação *in vitro* mostraram que Pso2p é um alvo de fosforilação de Pak1p. Assim, este trabalho tem como objetivo o uso de linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e defectivas para os genes *PSO2* e *PAK1* para o estudo da: (i) função da Pso2p, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, para a reparação de substratos de DNA contendo uma única ICL e (ii) interação da Pso2p com Pak1p recombinantes, em ensaios de reparação *in vitro* de substratos de DNA contendo uma ICL. Para a preparação do substrato de DNA com uma ICL por molécula, são utilizados dois oligonucleotídeos com regiões de homologia parcial, possibilitando a formação de uma fita dupla de DNA, que é posteriormente tratada com uma solução de 8-metoxipsoraleno (8-MOP) + UVA. Os fragmentos que contém a ICL são purificados pelo método *Crush and Soak* (Sambrook *et al*, 1989). Estes fragmentos de DNA serão utilizados nos ensaios de reparação *in vitro* (contendo o extrato celular das linhagens de *S. cerevisiae* e as proteínas recombinantes) e nos ensaios de reparação *in vivo* (sendo ligados ao plasmídeo YcpLac33, para a transformação das linhagens de *S. cerevisiae*). As regiões codificadoras de Pso2 e Pak1 de *S. cerevisiae* foram clonadas nos plasmídeos pGEX-KG e pGEX-4T2, respectivamente. Após, células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS foram transformadas por eletroporação e a expressão das proteínas recombinantes foi induzida com 0,3 mM de IPTG, a 37°C. Os corpúsculos de inclusão foram tratados com 1% de Triton X-100 e 0,5% de Sarkosyl para solubilização, e a seguir as proteínas foram purificadas com resina de afinidade Glutathione Sepharose™ 4B. Estudos complementares de co-imunoprecipitação estão sendo realizados para comprovar a interação física entre as proteínas Pso2 e Pak1. As proteínas imunoprecipitadas serão submetidas a ensaios de Western Blot, utilizando os anticorpos primários policlonais anti-Pso2 e anti-Pak1 e o anticorpo secundário anti-IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology Inc). Os resultados obtidos neste projeto permitirão visualizar um quadro mais completo sobre a função destas proteínas nos mecanismos de reparação de ICLs em células eucarióticas.