

Estratégias de geração de mutantes para estudos funcionais em *Metarhizium anisopliae*: Construção de linhagens $\Delta Ku70$

Alexia de Matos Czczot^{1,3}, Marilene Henning Vainstein^{2,3}

¹ Graduanda em Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

² Orientadora, PPGBCM Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

³ Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, Centro de Biotecnologia - Cbiot, UFRGS.

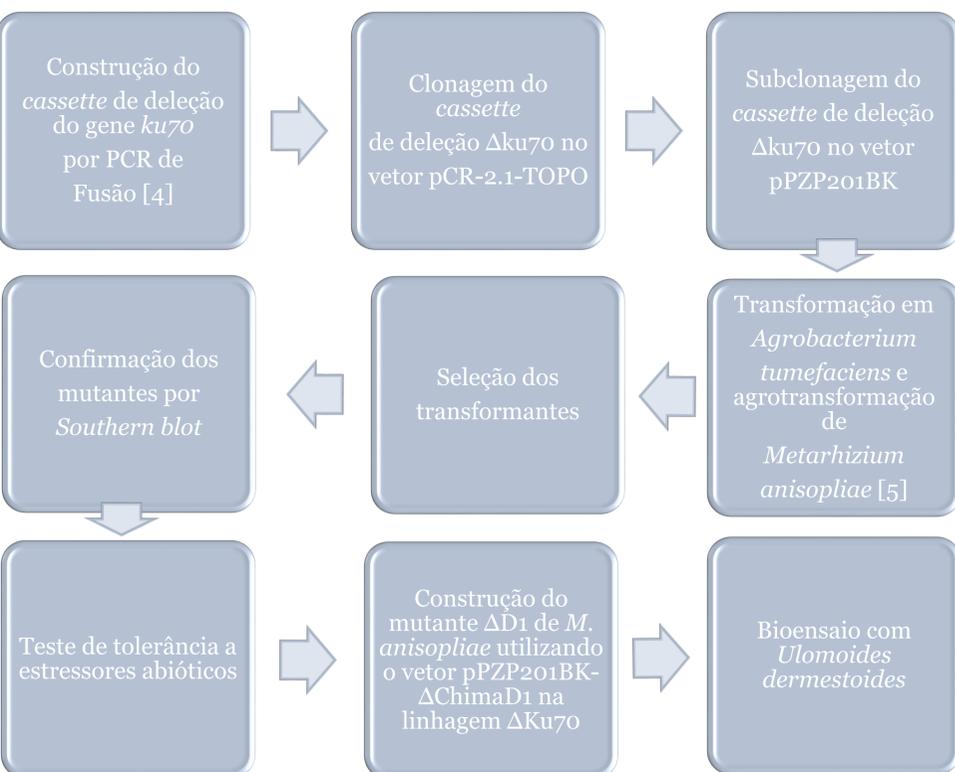
Introdução

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é um organismo-modelo para o estudo das interações patógenos-hospedeiros. A caracterização da função gênica pela construção de mutantes nulos é uma das abordagens mais utilizadas para caracterizar a infecção, realizada a partir da interrupção do *locus* de interesse via recombinação homóloga [1]. No entanto, a geração de mutantes nulos por recombinação homóloga exibe baixa eficiência em fungos filamentosos uma vez que a recombinação não homóloga é a principal via de reparo [2]. Entre as proteínas envolvidas neste processo estão o heterodímero Ku, proteína quinase dependente de DNA e o complexo ligase IV-Xrcc4. Sabe-se que mutantes na via de recombinação não homóloga aumentam a frequência de recombinação homóloga [3].

Objetivo

O objetivo deste trabalho é construir linhagens mutantes para o gene *ku70* a fim de aumentar a taxa de recombinação homóloga para que, posteriormente, possam ser construídos com maior eficiência mutantes funcionais para genes alvo em *M. anisopliae*.

Metodologia



Resultados

- Construção do *cassette* de deleção do gene *ku70*, contendo um *cassette* de expressão da marca de resistência ao antibiótico nourseotricina (gene *nat*) flanqueada por sequências homólogas às sequências adjacentes do *locus ku70*. Clonagem do *cassette* de deleção $\Delta Ku70$ e obtenção do vetor pPZP:: $\Delta Ku70$::*nat*, utilizado na transformação de *A. tumefaciens* e posterior agrotransformação de *M. anisopliae*.
- Obtenção de 385 transformantes resistentes a nourseotricina, com inserção do *cassette* de deleção, selecionados por PCR negativa, amplificando uma região interna do gene *ku70*, que deverá estar ausente caso a recombinação homóloga tenha ocorrido com eficiência.
- Obtenção de seis mutantes com o gene *ku70* interrompido, confirmados por *Southern blot*.

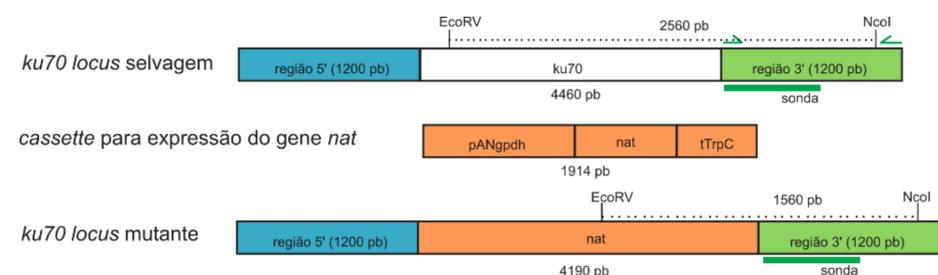


Fig. 1 Representação da hibridização entre o DNA da linhagem selvagem e $\Delta ku70$ digeridos com as enzimas *EcoRV* e *NcoI* e a sonda utilizada na *Southern blot*.

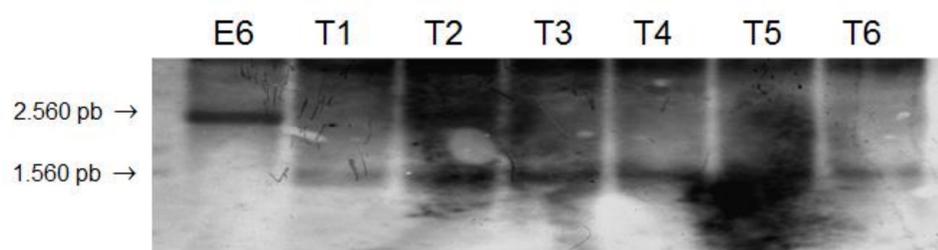


Fig. 2 Confirmação dos transformantes por *Southern blot*. E6=linhagem selvagem de *M. anisopliae*, com hibridização em 2.560 pb. T1-T6=mutantes com o *locus* do gene *ku70* interrompido, com hibridização em 1.560 pb.

- Ausência de diferença fenotípica entre os mutantes $\Delta Ku70$ e a linhagem selvagem na presença de estressores abióticos.

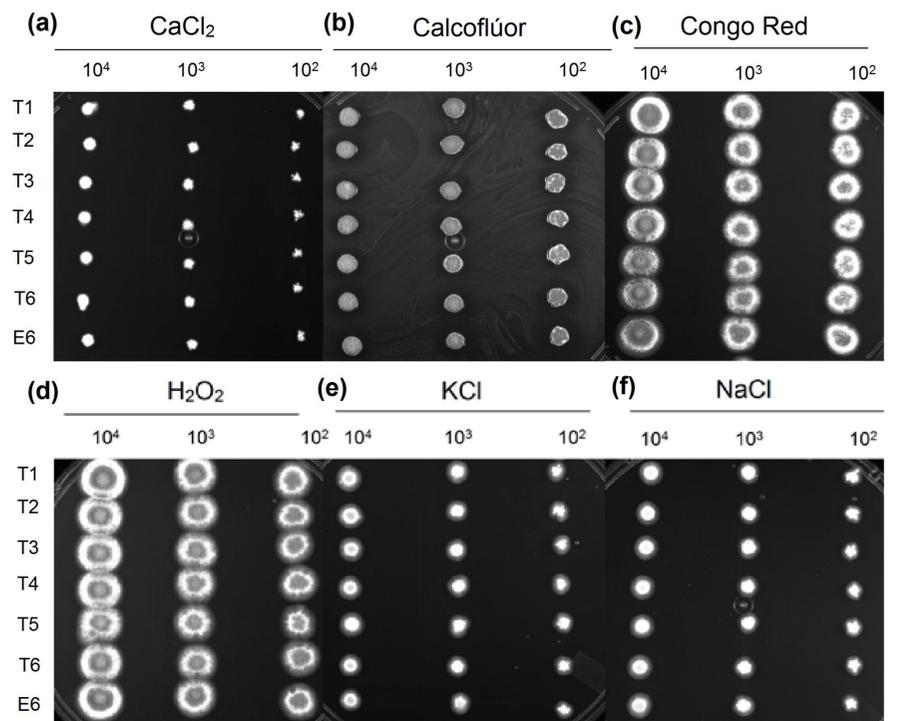


Fig. 3 Tolerância dos mutantes a estressores abióticos. 10^4 , 10^3 e 10^2 esporos cultivados a 28 °C durante 7 dias em Meio de Cove acrescido de 2 % de soluções de sais, 0,04 % de elementos traços e estressores: (a) 0,6 M $CaCl_2$, (b) 50 $\mu g/mL$ Calcoflúor, (c) 450 $\mu g/mL$ Congo Red, (d) 40 mM H_2O_2 , (e) 1 M KCl, (f) 1 M NaCl. E6 = linhagem selvagem, T1-T6= mutantes com o *locus* do gene *ku70* interrompido.

- Aumento na taxa de recombinação homóloga de 1 % na linhagem selvagem para 12,5 - 37,5 % na linhagem $\Delta Ku70$.

Linhagem	Nº de transformantes	Recombinação homóloga (%)
$\Delta Ku70$ T1	17	23,53
$\Delta Ku70$ T2	16	12,5
$\Delta Ku70$ T4	16	37,5
$\Delta Ku70$ T5	12	-
$\Delta Ku70$ T6	16	25

- A linhagem $\Delta Ku70$ de *M. anisopliae* não reduz sua capacidade de infecção em *Ulomoides dermestoides* quando comparada com a linhagem selvagem em nenhum dos tempos analisados, mesmo após 15 dias de infecção.

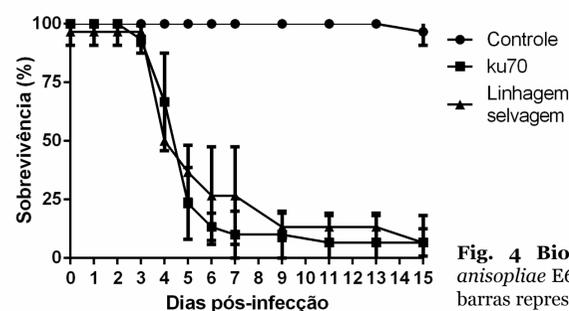


Fig. 4 Bioensaio. Eficiência de infecção de *M. anisopliae* E6 e $\Delta Ku70$ em *Ulomoides dermestoides*. As barras representam desvio padrão.

Conclusões

- A taxa de recombinação homóloga no mutante $\Delta ku70$ de *Metarhizium anisopliae* para a deleção do gene *chimaD1* aumentou de 1 % na linhagem selvagem para aproximadamente 40 % na linhagem $\Delta Ku70$, demonstrando a eficiência deste mutante em facilitar a obtenção de mutantes funcionais neste organismo.
- A taxa de crescimento e morfologia das linhagens $\Delta Ku70$ são similares a da linhagem selvagem, mesmo em presença de estressores abióticos.
- A eficiência de infecção em *Ulomoides dermestoides* não é afetada.

Perspectivas

- Avaliar se os mutantes $\Delta Ku70$ são mais suscetíveis a mutações por exposição a mutagênicos, como a radiação UV.

Referências

- Krappmann, S. (2007) Gene targeting in filamentous fungi: the benefits of impaired repair. *21*(1), 25–29.
- He, Y. *et al.* (2013) *Ku70* and *ku80* null mutants improve the gene targeting frequency in *Monascus ruber* M7. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 97, n. 11, p. 4965-76. ISSN 1432-0614.
- Carvalho, N. D. *et al.* Expanding the *ku70* toolbox for filamentous fungi: establishment of complementation vectors and recipient strains for advanced gene analyses. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 87, n. 4, p. 1463-73, Jul 2010. ISSN 1432-0614.
- Yu, J. H. *et al.* (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*, v. 41, n. 11, p. 973-81. ISSN 1087-1845.
- Staats, C. C. *et al.* (2007) Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 76, n. 4, p. 945-50. ISSN 0175-7598.