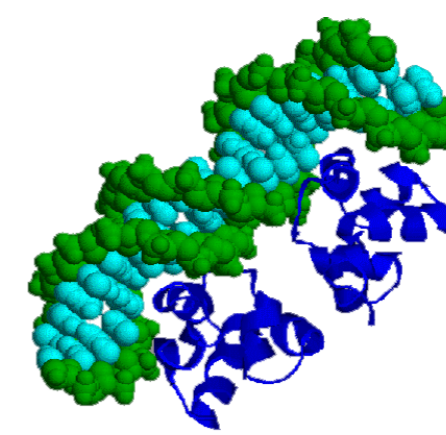


Padronização do sistema CRISPR/Cas9 em *Metarhizium anisopliae*

Augusto Penteriche¹, Augusto Schrank¹

¹Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil;



Introdução

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é utilizado como agente de controle biológico há mais de 100 anos, sendo capaz de infectar uma vasta gama de artrópodes praga e vetores de doenças. O sucesso do processo de infecção deste fungo depende de diversos fatores, dentre eles enzimas, como proteases, quitinases e lipases, além da produção de toxinas e estruturas celulares especializadas. Com o objetivo de melhor entender a biologia de *M. anisopliae*, a geração de mutantes funcionais para genes com provável envolvimento no processo de infecção tem sido um método de grande importância. No entanto, os presentes métodos de edição genômica são laboriosos e pouco efetivos. No entanto, a recente descoberta do sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas9 (*CRISPR associated protein 9*) como ferramenta para geração de mutantes funcionais têm se mostrado promissora, além de ser rápida e possuir um relativo baixo custo.

Este sistema se caracteriza por apresentar dois componentes principais: uma endonuclease Cas9 e um RNA-guia (sgRNA). A fim de inativar um gene de interesse, o sgRNA (cerca de 20 nucleotídeos complementares ao gene alvo) guia a endonuclease para a sequência específica, a qual catalisa uma quebra na dupla fita de DNA.

Embora o sistema CRISPR/Cas9 tenha sido utilizado em diversas espécies, incluindo fungos filamentosos como *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa*, sua aplicação em *M. anisopliae* ainda necessita ser avaliada. Assim, o objetivo deste trabalho consiste em padronizar este sistema na linhagem E6 de *M. anisopliae*.

Resultados

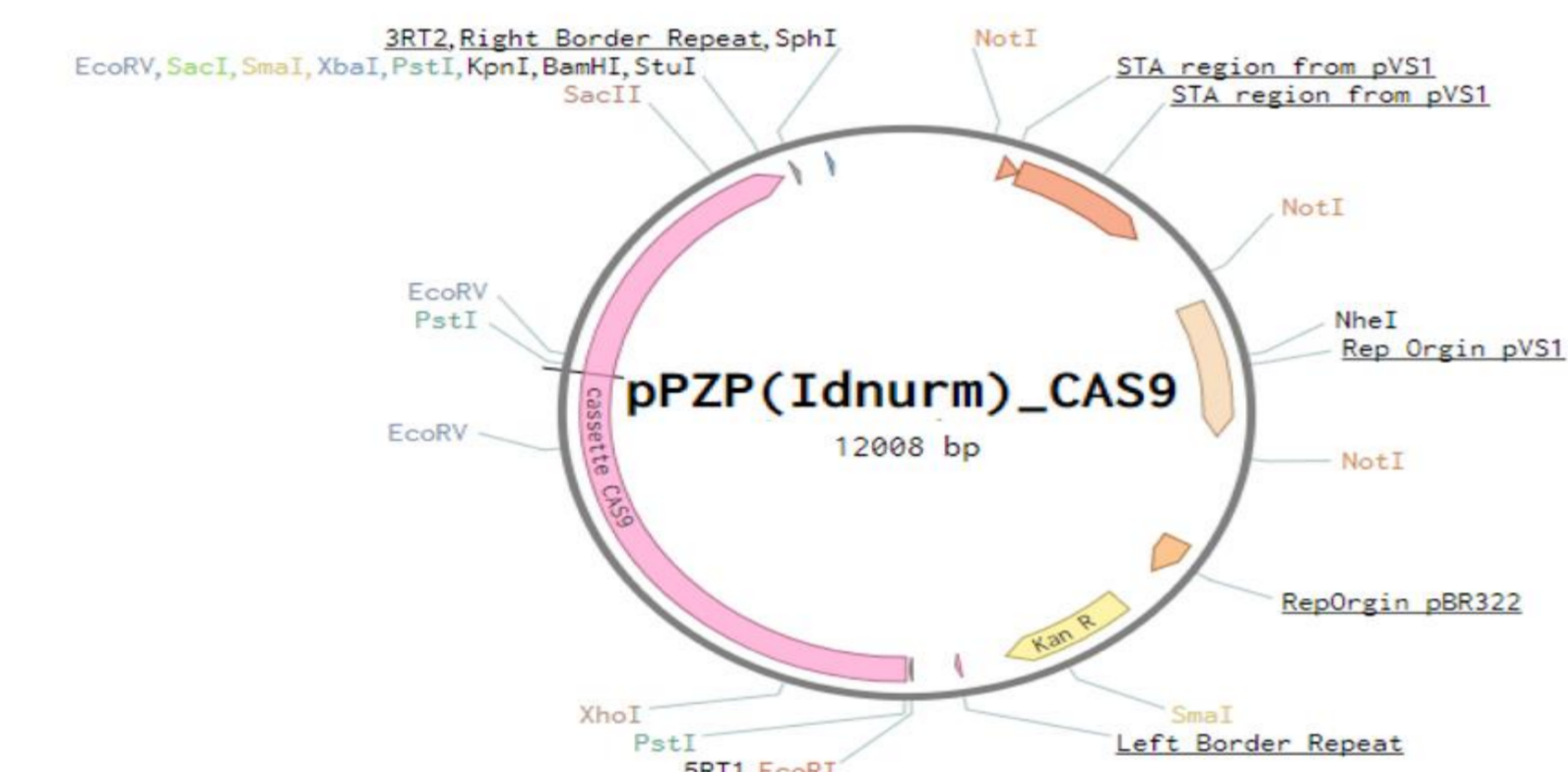


Fig. 1: Vetor binário contendo o *cassette* para expressão da endonuclease Cas9.

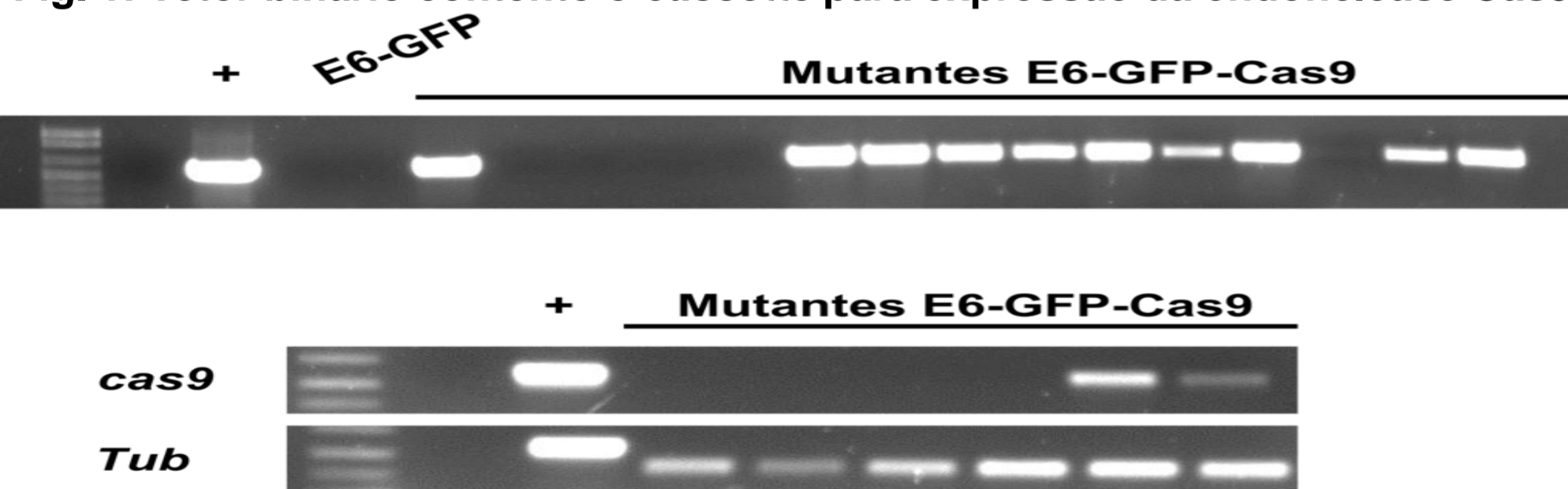


Fig. 2: Análise dos mutantes com a possível expressão da endonuclease Cas9. Mutantes oriundos da ATMT foram, inicialmente, por PCR, analisados para a presença do gene que codifica para a endonuclease Cas9. Posteriormente, os mutantes que apresentaram amplificação no primeiro ensaio foram submetidos a técnica de RT-PCR, a fim de avaliar a possível expressão da endonuclease, apenas dois mutantes apresentaram expressão putativa.

Suporte Financeiro



Resultados

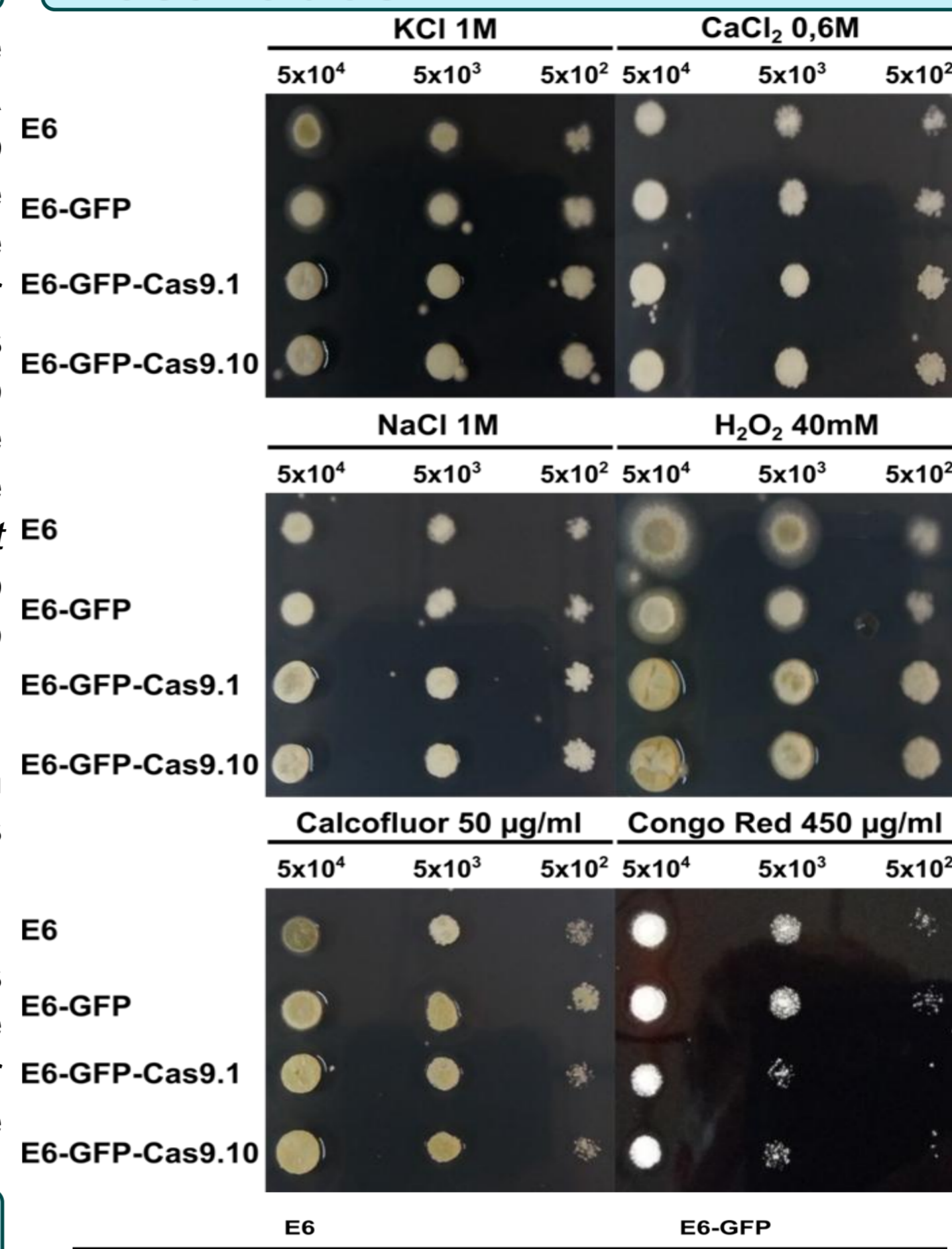


Fig. 3: Ensaio com estressores.

Linhagem selvagem, linhagem mutante expressando GFP e linhagens mutantes expressando GFP e Cas9 (1 e 10) foram crescidas em meio mínimo acrescido de CaCl₂ 0,6 M, Calcofluor White 50 µg/ml, CongoRed 450 µg/ml, H₂O₂ 40mM, KCl 1M and NaCl 1M por 7 dias com diferentes concentrações de esporos. Estes ensaios foram realizados a fim de verificar e discriminar possíveis alterações na susceptibilidade das linhagens mutantes expressando Cas9 a diferentes estressores.

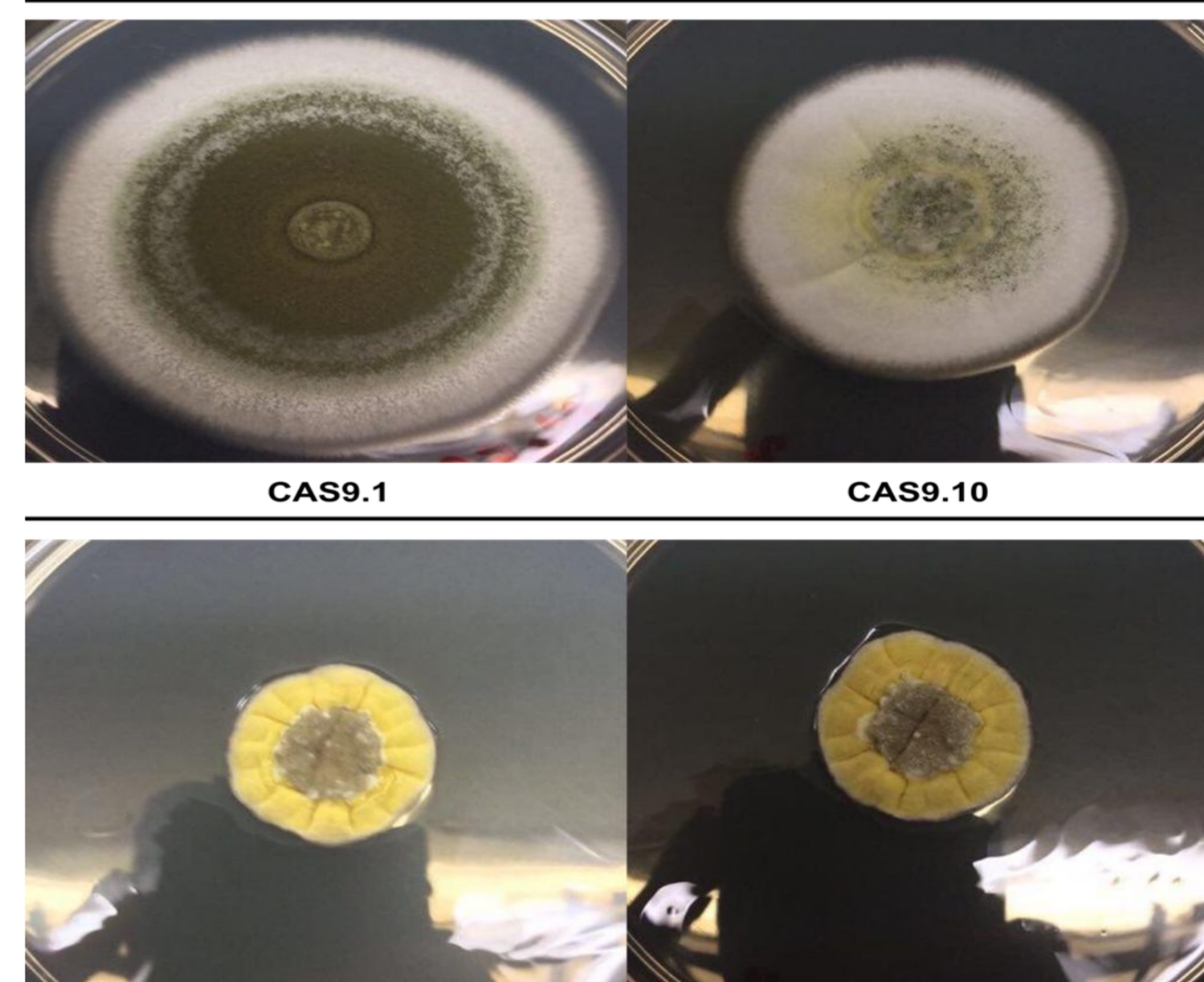


Fig. 4: Morfologia de colônia da linhagem selvagem (E6), E6-GFP e dos mutantes com expressão putativa da endonuclease Cas9 (Cas9.1 e Cas9.10) quando crescidos em meio rico (MCC)

Conclusões e Perspectivas

Inicialmente, tentou-se construir linhagens de *M. anisopliae* que expressassem constitutivamente a endonuclease Cas9. Através do método de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) e um vetor binário contendo o *cassette* para expressão da endonuclease Cas9 (Fig.1), linhagens de *M. anisopliae* E6 e *M. anisopliae* E6 expressando GFP (*Green fluorescent protein*) foram transformadas. Após três eventos de transformação independentes em ambas as linhagens, apenas dois mutantes *M. anisopliae* E6 +*gfp* com transcritos detectados para *cas9* foram isolados (mutantes E6-GFP-Cas9.1 e E6-GFP-Cas9.10) (Fig. 2). Estes mutantes apresentavam nítidas alterações no crescimento e esporulação quando comparados com a linhagem controle (Fig.3 e 4). Adicionalmente, foi feita a transformação de sgRNAs via ATMT com o objetivo de interromper o gene *gfp*; no entanto, não houve funcionalidade do sistema CRISPR/Cas9 nestas linhagens.

A dificuldade em isolar transformantes que ativamente expressem a endonuclease Cas9, bem como as disfunções morfológicas apresentadas pelas únicas linhagens isoladas e a não funcionalidade do sistema CRISPR/Cas9 nas mesmas indicam que a expressão desta proteína pode ser tóxica para *M. anisopliae*. Assim, métodos completos que visem atenuar a toxicidade do sistema CRISPR/Cas9 estão sendo testados, bem como mais estudos são necessários a fim de validar e padronizar este sistema neste fungo.