



XXXV SALÃO de INICIAÇÃO CIENTÍFICA

6 a 10 de novembro

Evento	Salão UFRGS 2023: SIC - XXXV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2023
Local	Campus Centro - UFRGS
Título	Desenvolvimento de estratégias de complementação gênica de mutantes nulos em <i>Cryptococcus gattii</i>
Autor	CAROLINA FARIAS STADKOWISKI
Orientador	CHARLEY CHRISTIAN STAATS

Desenvolvimento de estratégias de complementação gênica de mutantes nulos em *Cryptococcus gattii*

Autor: Carolina Farias Stadkowiski

Orientador: Charley Christian Staats

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Fungos do gênero *Cryptococcus* são considerados patógenos ambientais oportunistas, importantes causadores de meningoencefalite em humanos. As opções de tratamento contra criptococose ainda são limitadas devido a similaridade das estruturas do patógeno com as estruturas celulares humanas. Assim, como resultado dos avanços nas últimas décadas de estudos usando técnicas de genética molecular e bioinformática, é possível caracterizar e identificar a função de genes e assim compreender os mecanismos que envolvem a patogenicidade dos microrganismos. Neste contexto, a construção de mutantes nulos e de mutantes nulos complementados com o gene selvagem, de acordo com os postulados moleculares de Koch, apresentam-se como importante estratégia para definição de novos alvos moleculares para desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Justificativa: Considerando que as estratégias de complementação de mutantes nulos se baseiam majoritariamente na integração de um cassete, contendo o gene selvagem, de modo aleatório no genoma da linhagem mutante nula para o gene de interesse, pode haver efeitos inesperados pelo potencial efeito genotóxico.

Objetivos: Desenvolver um sistema para complementação gênica de linhagens nulas complementadas empregando o sistema CRISPR-CAS9. **Metodologia:** A construção do cassete de complementação do mutante nulo para o gene *nop16*, aqui empregado como protótipo, foi realizada empregando a metodologia de clonagem livre de ligase *Hot Fusion*. A construção do cassete de expressão transitória de um gRNA que tem como alvo a marca de seleção Hyg, presente no mutante *nop16*, foi realizado por *overlapping fusion* PCR. **Resultados:** Foi possível amplificar do genoma da linhagem R265 de *C. gattii* um amplicon referente ao gene *NOP16* acrescido de potenciais regiões regulatórias (1kb *upstream* e *downstream*), sendo então clonado no vetor pJAF1, que contém a marca de seleção que confere resistência a G418. Também foi produzido um cassete para expressão transitória de um gRNA, que tem como alvo a marca de seleção Hyg, presente no cassete de inativação do gene *NOP16* do mutante nulo *nop16*. Experimentos de co-transformação do cassete de complementação, do cassete de expressão transitória do gRNA, bem como do cassete de expressão transitória de Cas9, presente no plasmídeo pBHM2403, com o intuito de isolar linhagens sensíveis a higromicina e resistentes a G418, o que sugere a quebra dupla de DNA em Hyg e recombinação homóloga com o cassete de complementação (G418). Tais linhagens serão então avaliadas genotipicamente quanto à correta integração do cassete.