

Métodos de Biología Molecular de hongos

BMM5919

Dr Gabriela Mol Avelar Tamaki

University of Dundee



TRANSFORMAÇÃO EM FUNGOS

Primeira transformação genética foi feita com *N. crassa* (Mishra and Tatum 1973)

Transformação por protoplastos e PEG (Hinnen et al., 1978)

Eletrotransformação (Karube et al., 1985),

Biobalística (Armaleo et al., 1990)

Transformação por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) (de Groot et al., 1998),

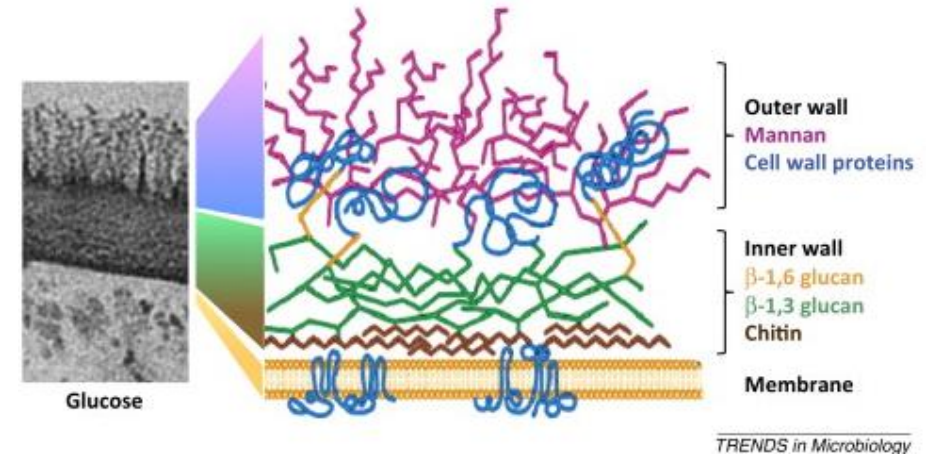
RNA de interferência (RNAi) (Akashi et al., 2005)

Transformação celular

Desafio para transformação de fungos:

☐ Parede celular

- Digestão enzimática - Protoplastos
- Induzir a permeabilidade celular com altas concentrações de íons cátions como utilizando o acetato de lítio
- Pulso elétrico gera polarização de componentes estruturais da membrana celular a parede e rompida em áreas específicas
- Biobalística onde partículas de ouro ou tungstênio são aceleradas contra a célula alvo



Gow NA et al. 2011 Nat Rev Microbiol.

Transformação celular

Desafio para transformação de fungos:

☐ Seleção de marcadores

- Existem linhagens bem caracterizadas auxotróficas, mas estão limitadas a algumas espécies (*S. cerevisiae*, *N. crassa*, e *A. nidulans*)
- Marcadores auxotróficos comuns: *leu2*, *ade2*, *his3*, *trp1*, *ura3*
- Genes que conferem resistência a algumas drogas como Hygromicina B e nourseotrecina

Métodos para estudar um gene / proteína

Knockout (deleção)

Expressão condicional - Promotor induzível / expressão controlada ou constitutivo

Expressão heteróloga

Fusão de promotor do gene com proteína repórter

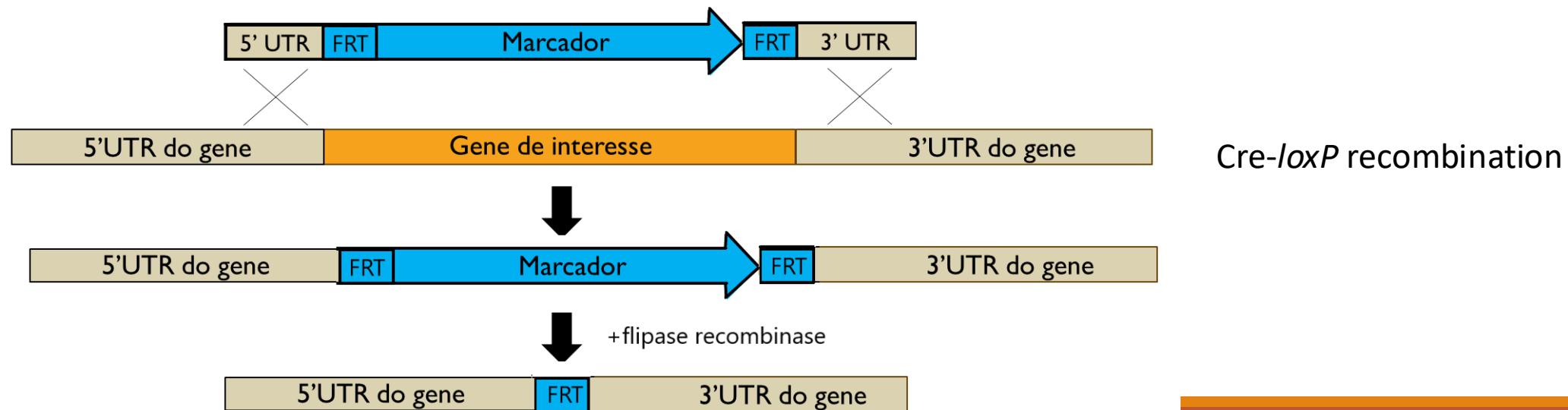
RNA de interferência

Métodos para estudar um gene / proteína

Knockout (deleção) - Remover geneticamente o gene de interesse e observar seus efeitos no fenótipo

Plasmídeo- normalmente clona-se as regiões franqueadoras do gene e um marcador em um plasmídeo

Alguns sistemas de recombinação podem ser utilizados para remover o marcador em um segundo passo

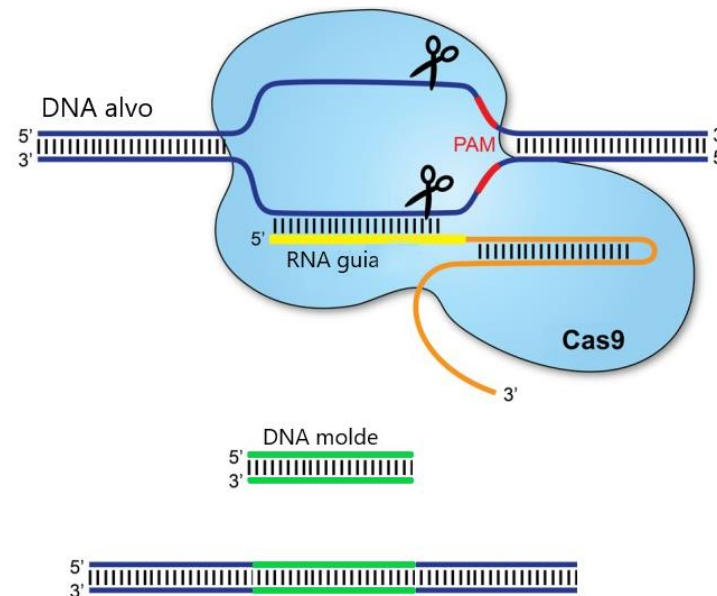


Métodos para estudar um gene / proteína

Knockout (deleção) - Remover geneticamente o gene de interesse e observar seus efeitos no fenótipo

CRISPR-Cas9 - Vantagens: Teoricamente pode ser usado para qualquer gene em qualquer organismo
não precisa de clonagem

Rápido e eficiente



Métodos para estudar um gene / proteína

Expressão heteróloga – expressão de um gene ou de um fragmento de um gene em um organismo hospedeiro que não o possui naturalmente

Organismos comumente utilizados: *E. coli*, leveduras (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*), células imortalizadas de mamíferos e oócitos de anfíbios (ou seja, ovos não fertilizados)

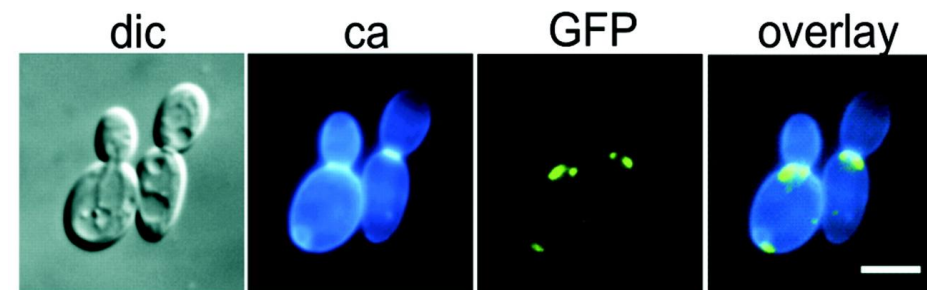
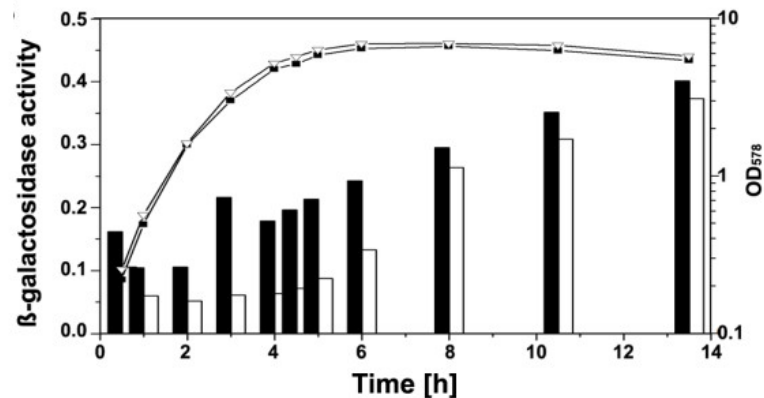
Possibilidade de produção em grandes quantidades para estudos in vitro como estudos enzimáticos e resolução da estrutura por métodos como a cristalização

A escolha do organismo vai depender da complexidade da proteína

Métodos para estudar um gene / proteína

Fusão do promotor do gene ou do gene em si com proteína repórter – a expressão de Somente o promotor com proteínas repórter como luciferase, Lac Z– quantificação da expressão

Fusão do gene com proteínas fluorescentes - localização



Dünkler A, Wendland J 2007. *Candida albicans* Rho-Type GTPase-Encoding Genes Required for Polarized Cell Growth and Cell Separation. Eukaryot Cell 6:.

Métodos para estudar um gene / proteína

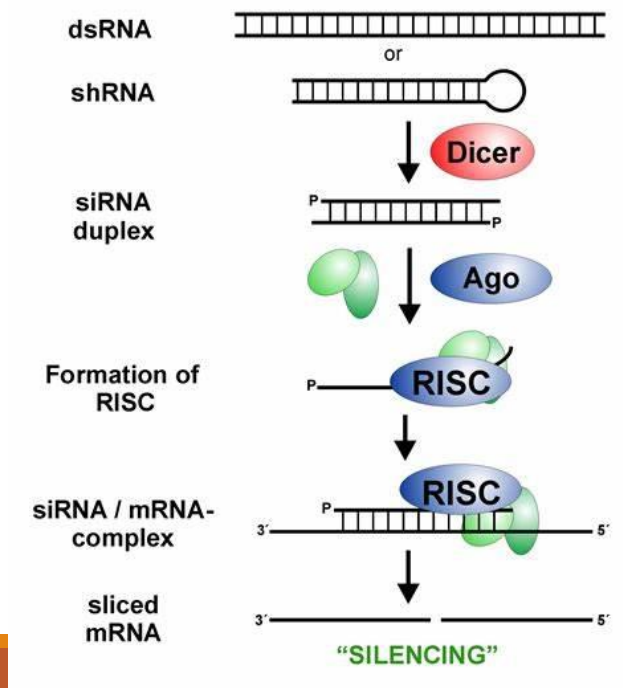
RNA de interferência – sequencias pequenas de RNA que se ligam no RNA mensageiro levando a sua degradação ou supressão da tradução

Vantagem:

- permite estudar os efeitos da redução da expressão de determinado gene sem alterar o DNA genômico
- Pode ser vantajoso para estudo de genes essenciais por exemplo

Desvantagem:

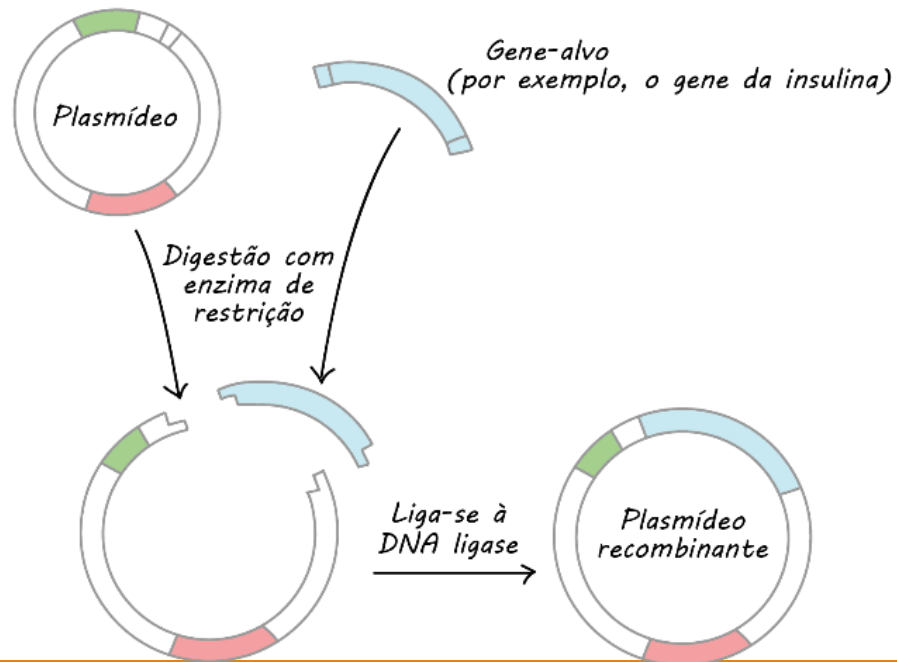
- Inativação pode não ser completa e pode variar entre experimentos
- Possibilidade de inativação inespecífica de genes apresentando homologia



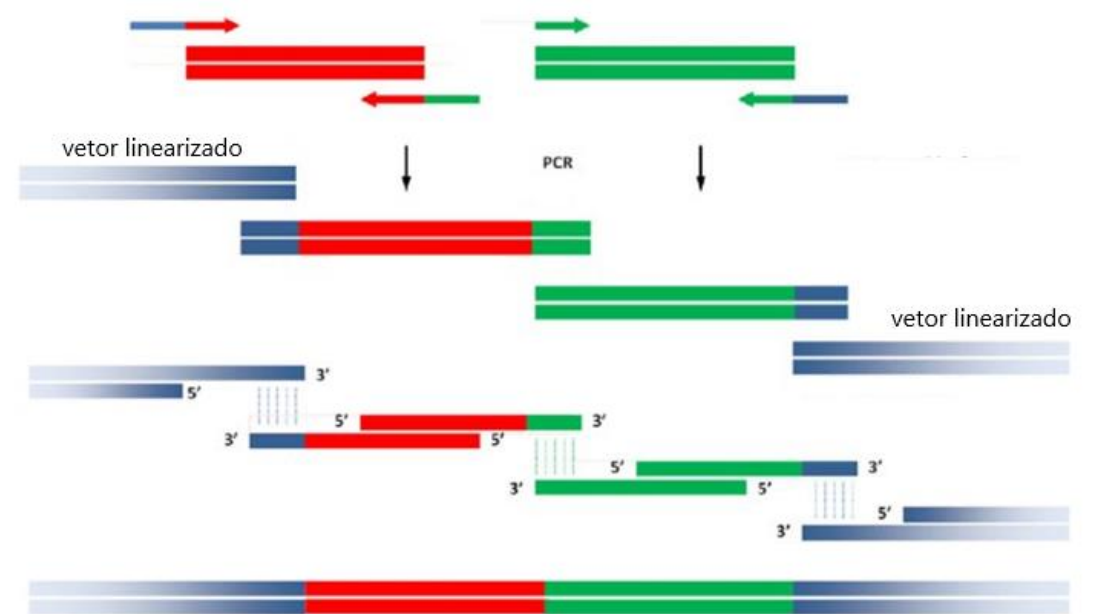
Métodos para estudar um gene / proteína

Clonagem molecular

Enzimas para a manipulação de DNA



Gibson assembly



Transformação celular

Choque térmico

Eletroporação

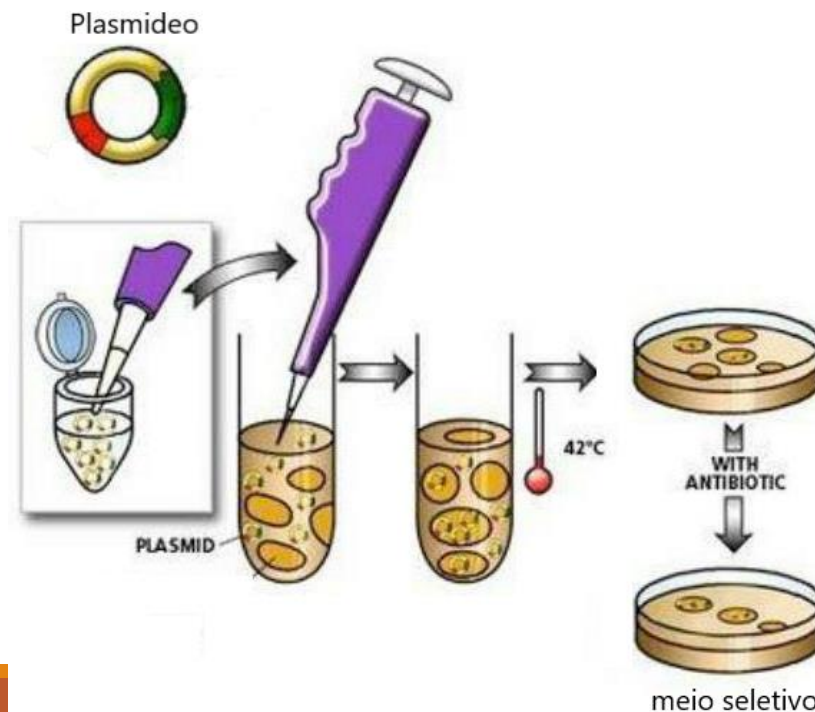
Protoplastos

Bombardeamento de Partículas

Agrobacterium tumefaciens

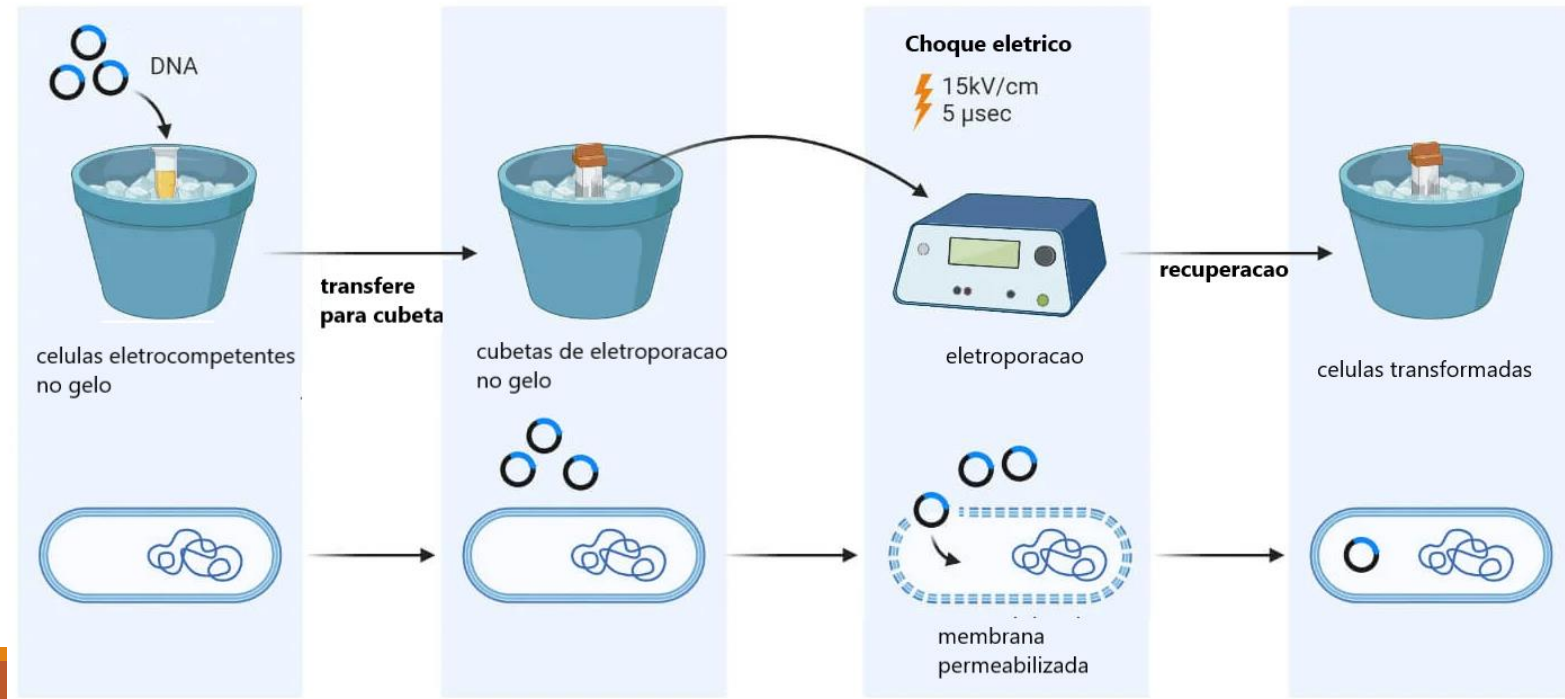
Transformação celular

Choque térmico – o aumento de temperatura aliado ao tratamento com PEG (polietilenoglicol) que liga o DNA a parede celular e ao acetato de lítio que cria poros na membrana facilita a entrada do DNA



Transformação celular

Eletroporação – quando expostos a uma corrente elétrica, os componentes da membrana se tornam polarizados criando um potencial de membrana. Quando ultrapassa um limite, a membrana quebra em pequenas áreas se tornando permeável ao DNA exógeno.



Transformação celular

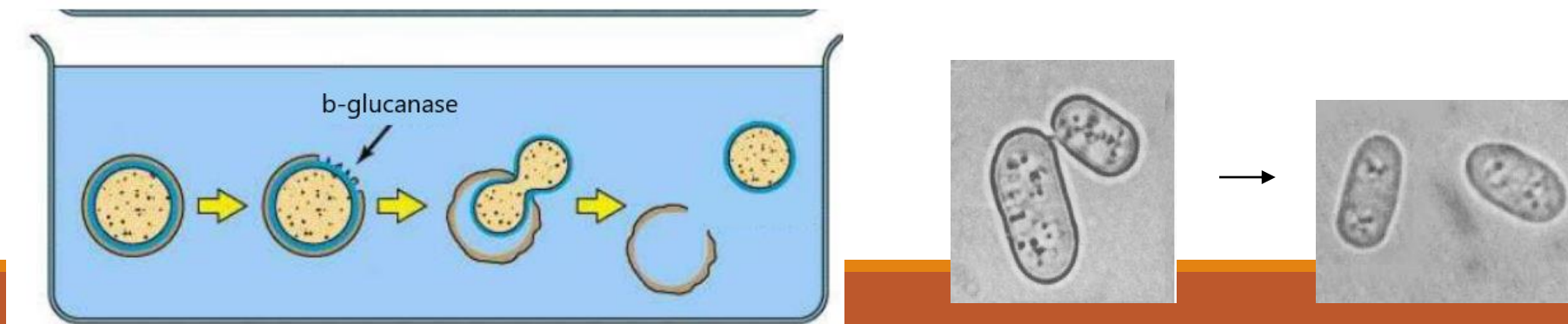
Protoplastos – a parede celular é digerida enzimaticamente com liticase seguido por tratamento com cloreto de cálcio e PEG para produção de poros na membrana, o que permite a passagem do DNA.

Vantagens: boa eficiência, possibilidade de transformação cromossomos artificiais e grandes plasmídeos e abrangência de espécies

Desvantagens: Precisa de um estabilizantes osmótico uma vez que as células sem parede se tornam bastante frágeis

Seleção com antibióticos não é fácil já que normalmente eles são sensíveis a antibióticos

Processo longo – 1 semana



Transformação celular

Bombardeamento de Partículas –micropartículas de ouro ou tungstênio são adsorvidas com DNA a ser transformado são aceleradas a uma alta velocidade por pressão de gás hélio em direção a células a serem transformadas. As partículas atravessam a parede célula entregando o DNA exógeno.

A distancia do bombardeamento, a aceleração e a escolha das partículas são importantes e devem ser ajustadas para a célula alvo

Transformação celular

Agrobacterium – A observaram que a maquinaria de transferência T-DNA poderia agir não somente no plasmídeo-Ti-plasmid permitiu a criação de sistemas binários de vetores. Nesses a maquinaria T-DNA do Ti-plasmídeo foi movida para plasmídeos menores e os genes que causariam tumor foram removidos.

Essa técnica pode atingir um alto número de transformantes sendo até seis vezes mais eficiente comparada com transformação por protoplastos/PEG (Michielse et al. 2005)

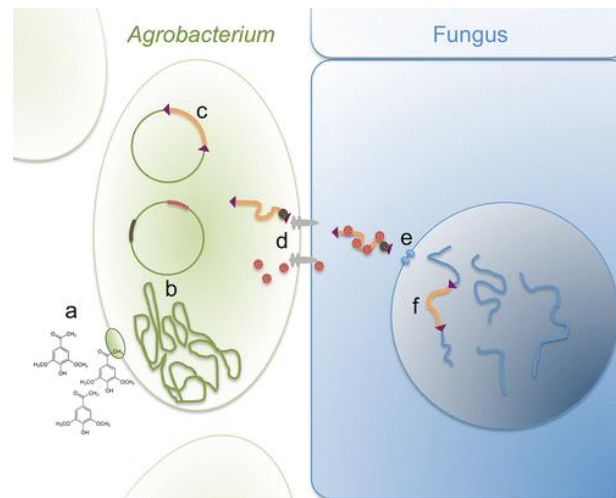
Seu uso em ascomicetos vem sendo feito com sucesso desde seu início mas o uso em basidiomicetos tem sido problemático devido à incompatibilidade de marcadores e promotores (Lugones et al. 1999).

Mais recentemente esse problema vem sendo solucionado com manipulação genética atingindo alguns sucessos em basidiomicetos.

Transformação celular

Comparada com outras técnicas de transformação AMT permite transferir grandes fragmentos de DNA. Takken e colaboradores transferiram fragmentos de até 75 kb DNA para *Fusarium oxysporum* (Takken et al. 2004)

Desvantagem: técnica mais demorada e complexa e possibilidade de integração em pontos aleatórios do genoma





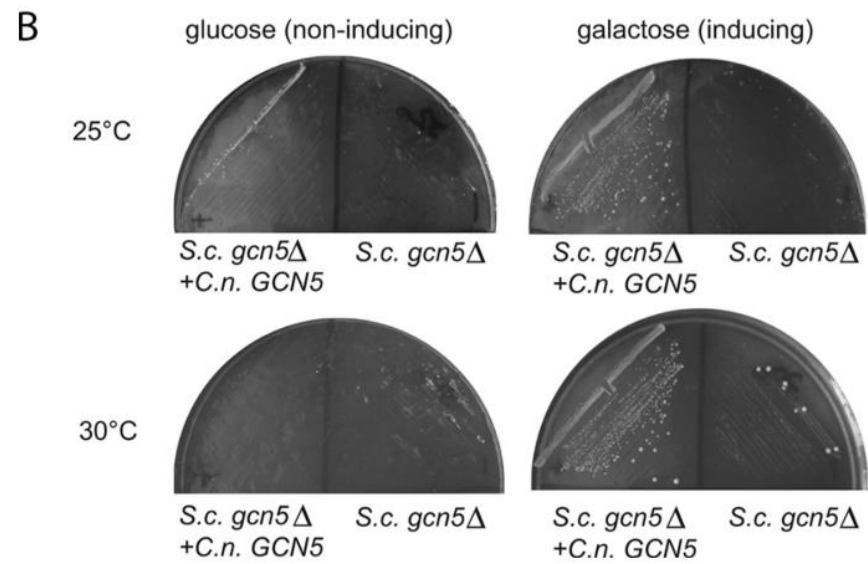
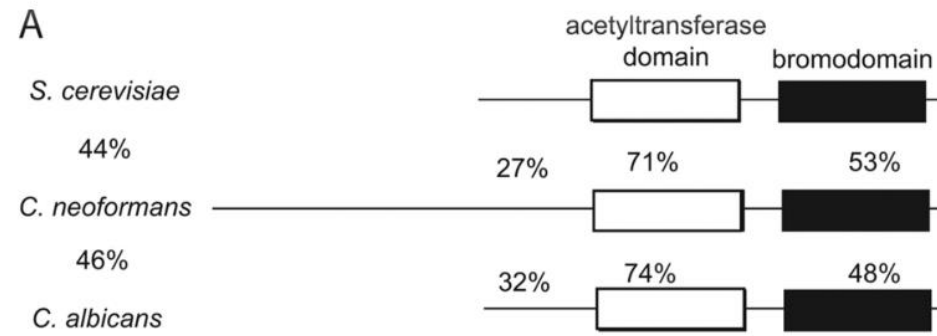
ARTICLES

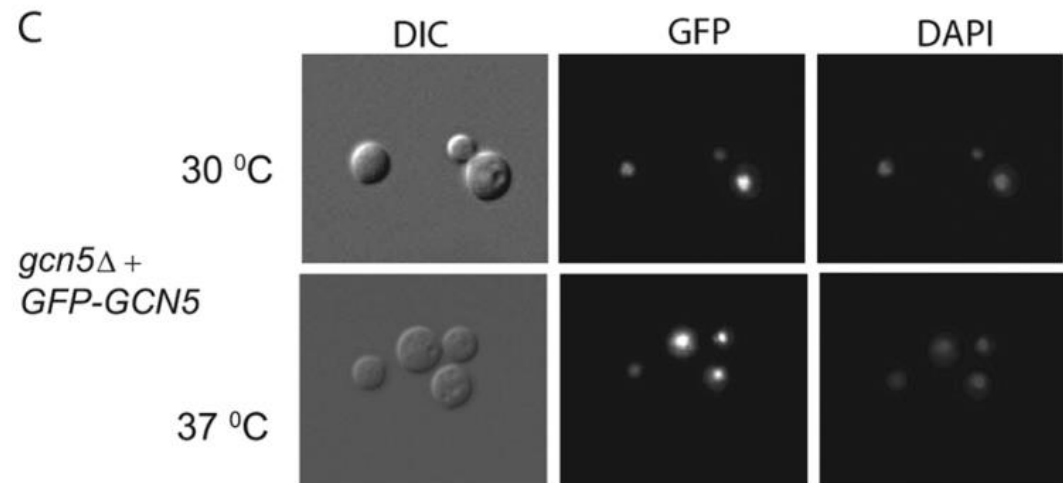
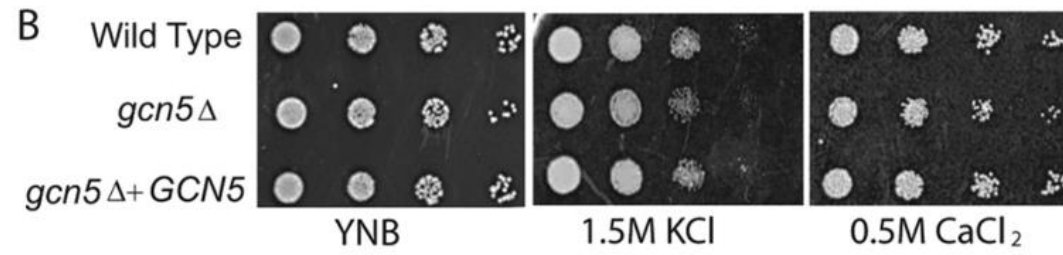
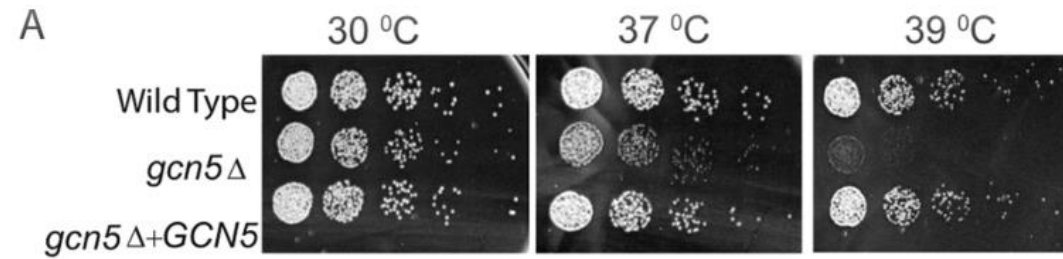
August 2010 Volume 9 Issue 8
<https://doi.org/10.1128/ec.00098-10>

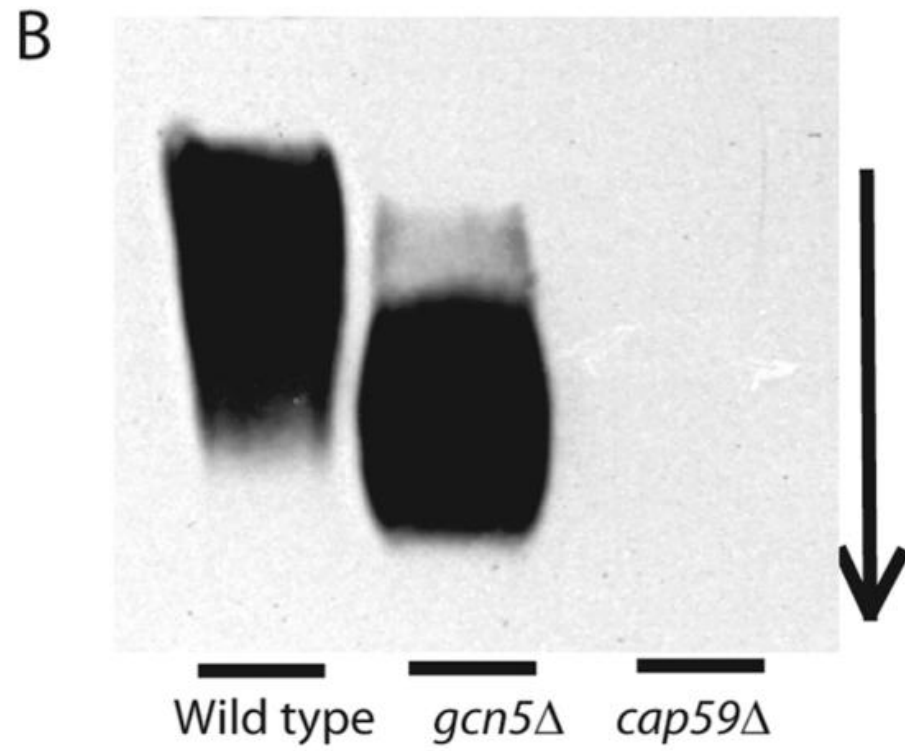
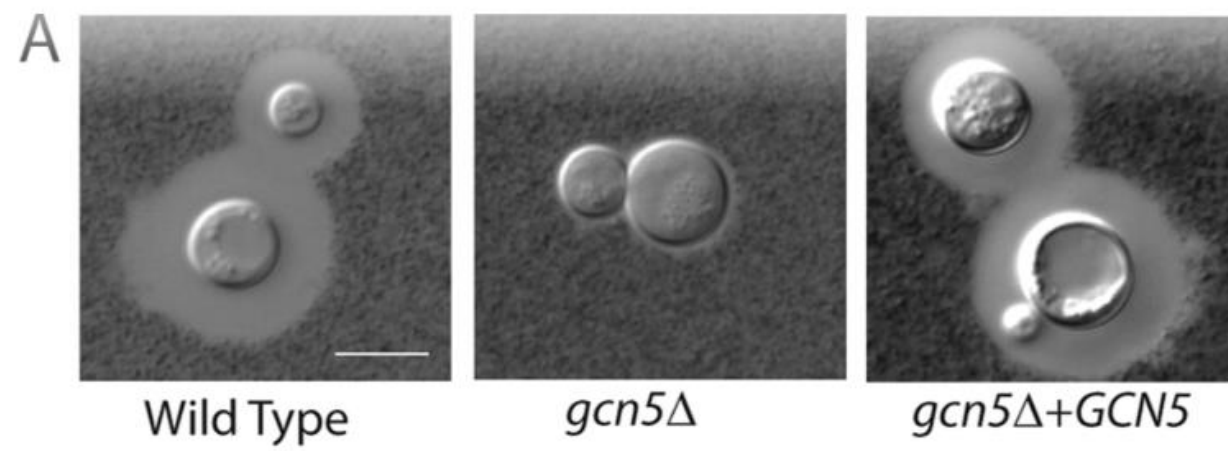
***Cryptococcus neoformans* Histone Acetyltransferase Gcn5 Regulates Fungal Adaptation to the Host**

Teresa R. O'Meara, Christie Hay, Michael S. Price, Steve Giles, J. Andrew Alspaugh*

Departments of Medicine and Molecular Genetics/Microbiology, Duke University School of Medicine,
Durham, North Carolina 27710







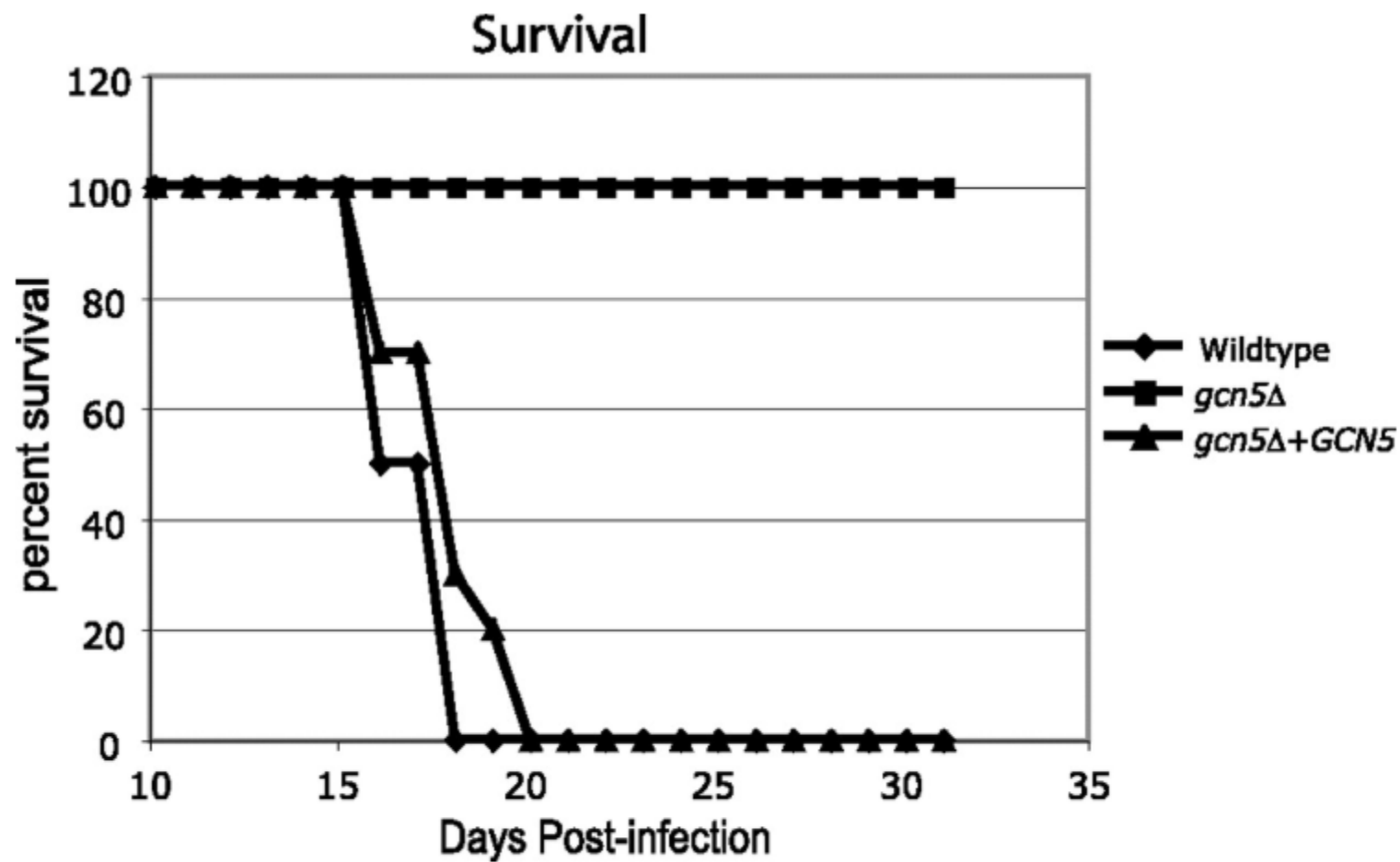
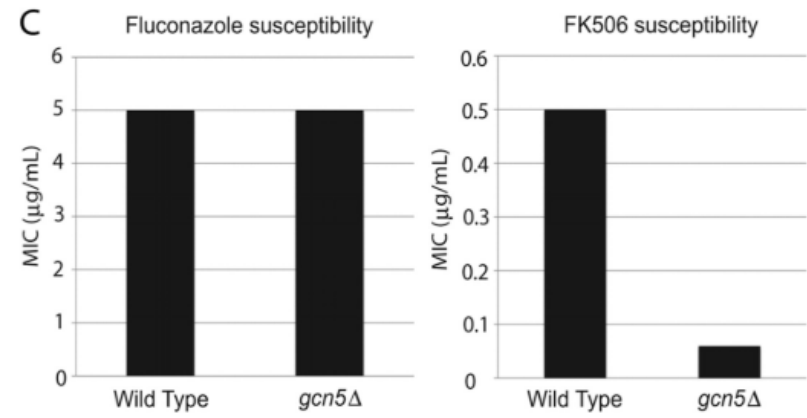
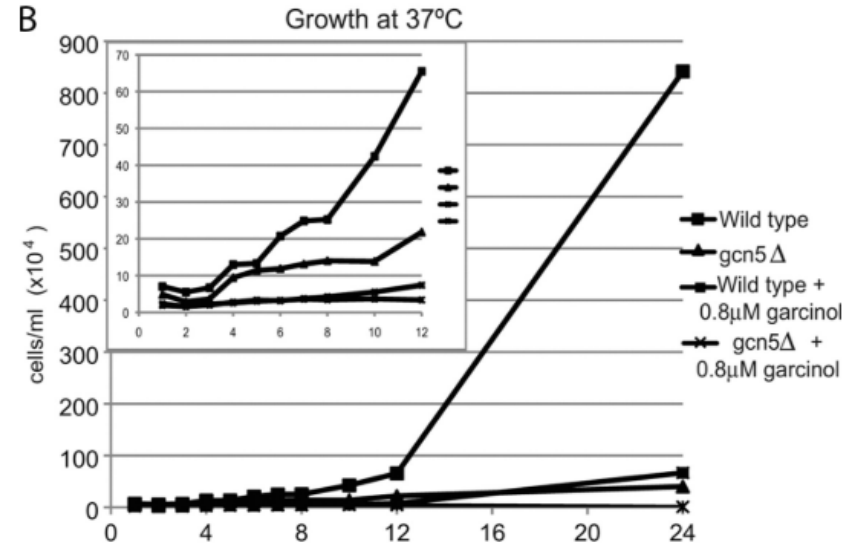
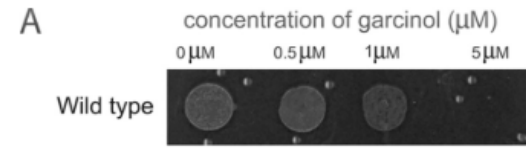


FIG. 4. Virulence analysis of the *gcn5* Δ mutant strain. AJc/r mice were inoculated intranasally with 5×10^5 cryptococcal cells and monitored for survival.



Referencias

OLMEDO-MONFIL, V., CORTÉS-PENAGOS, C., HERRERA-ESTRELLA, A. (2004). THREE DECADES OF FUNGAL TRANSFORMATION. IN: BALBÁS, P., LORENCE, A. (EDS) RECOMBINANT GENE EXPRESSION. METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL 267. HUMANA PRESS.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1385/1-59259-774-2:297](https://doi.org/10.1385/1-59259-774-2:297)

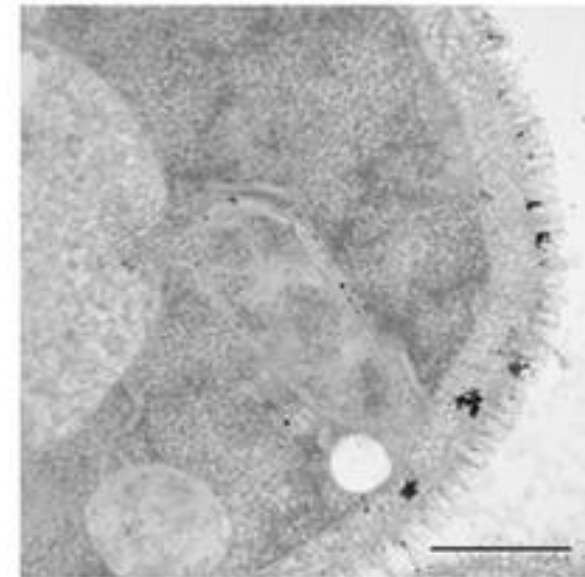
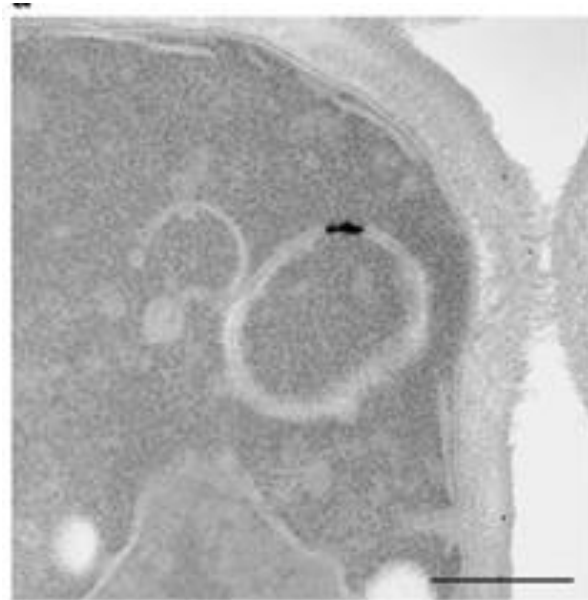
BACHELLIER-BASSI, S., D'ENFERT, C. (2015). CHEMICAL TRANSFORMATION OF *CANDIDA ALBICANS* . IN: VAN DEN BERG, M., MARUTHACHALAM, K. (EDS) GENETIC TRANSFORMATION SYSTEMS IN FUNGI, VOLUME 1. FUNGAL BIOLOGY. SPRINGER, CHAM.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1007/978-3-319-10142-2_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-10142-2_7)

Pham, T.A., Kawai, S., Kono, E. *et al.* The Role of Cell Wall Revealed by the Visualization of *Saccharomyces cerevisiae* Transformation. *Curr Microbiol* **62**, 956–961 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9807-y>

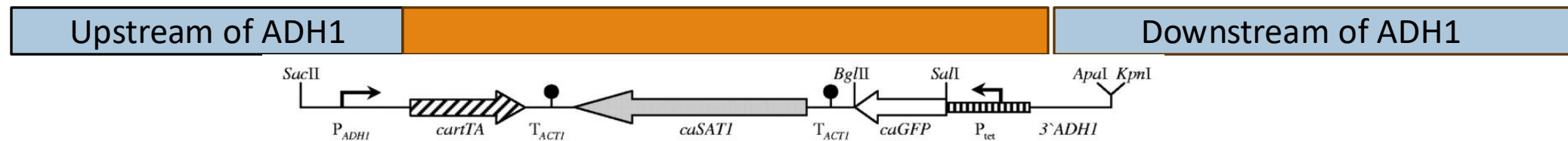
O'Meara TR, Hay C, Price MS, Giles S, Alspaugh JA. Cryptococcus neoformans histone acetyltransferase Gcn5 regulates fungal adaptation to the host. *Eukaryot Cell*. 2010 Aug;9(8):1193-202. doi: 10.1128/EC.00098-10. Epub 2010 Jun 25. PMID: 20581290; PMCID: PMC2918934.

Transformação celular

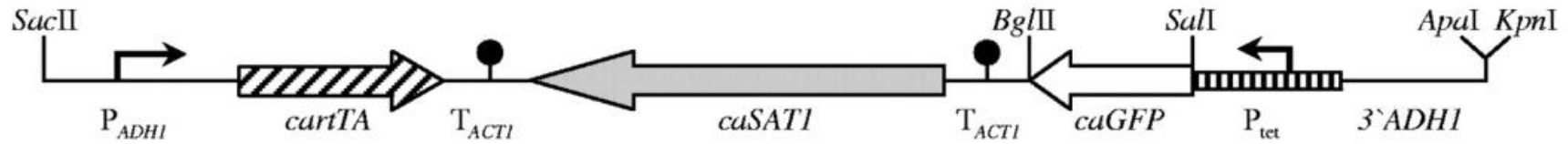
Cátions monovalentes como Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , e especialmente Li^+ interagem com a membrana tornando-a mais porosa e a fazem ligar o DNA



O gene ADH1 em *Saccharomyces cerevisiae* está envolvido no metabolismo de álcool.
Ele codifica uma álcool desidrogenase que reduz acetaldeído a etanol durante a fermentação da glicose.



Inserção de promotor induzível por tetraciclina seguido da proteína fluorescente verde GFP



cartTA –*Candida albicans* reverse tetracycline-controlled activator – produz um fator de transcrição que ao se ligar a tetraciclina se liga ao promotor *P_{tet}* induzindo a transcrição de *caGFP*

caSAT1 –Resistencia a nouseotricina
