Construção de vetores de expressão de proteínas fluorescentes para análise funcional de IRES em *Metarhizium anisopliae*.

Júlia Catarina Vieira Reuwsaat, Rana Louise de Andrade da Paixão, Ângela Junges, Charley Staats, Augusto Schrank.

Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBiot/UFRGS), Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), Av. Bento Gonçalves, 9500—Bloco IV, Prédio 43-421, Bairro Agronomia, CEP 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

As proteínas fluorescentes, como GFP e mCherry, são muito utilizadas como marcadores de expressão e de localização sub-celular de proteínas *in vivo*. Este trabalho tem como objetivo testar, em nosso modelo de estudo, o fungo filamentoso *M.anisopliae*, a expressão de duas proteínas fluorescentes, yeCherry e yeGFP. Essas proteínas foram modificadas para o aumento de expressão em leveduras e serão construídos vetores com as mesmas para verificar a funcionalidade de sequências IRES em *M.anisopliae*. Sequências IRES (*internal ribosomal entry site*) em células eucarióticas atuam como sítio interno de ligação de ribossomos para inicio de tradução que é flanqueado por duas ORFs e funcionam independentemente do sítio original de início da tradução. Mesmo tendo sido identificadas em fungos, não há descrição de IRES em *M.anisopliae* e não existem relatos do uso de IRES neste sistema. Se as IRES de levedura forem funcionais em *Metarhizium* seria possível construir vetores para a expressão de proteínas múltiplas a partir de um único promotor.Para verificar a expressão das proteínas fluorescentes yeCherry e yeGFP em *M. anisopliae*, serão construídos em plasmideos os *cassettes* pYECHERRY e pYEGFP. Essas construções serão realizadas através da clonagem dos fragmentos yeCherry e yeGFP no vetor pUC18, o qual já possui a região promotora do gene *tef-1* de *M. anisopliae* (pTEF) e a região terminadora do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans* (tTRPC). Os fragmentos foram amplificados a partir do plasmídeo pGADT7-ADH700-yeCherry-p150-yeGFP-DHFR, constituído das duas sequências, por PCR e posteriormente purificados. O vetor pTEF/TRPC e os fragmentos amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição, *Kpn*I e *Bam*HI e os produtos da ligação foram transformados para *E.coli* XL1-blue, por eletroporação. O *screening* das colônias foi feito por reação de PCR e por digestão com enzimas de restrição. Para verificar se yeCherry e yeGFP serão expressas em *M. anisopliae*, realizaremos bombardeamento ou agrotransformação para posterior visualização de fluorescência no fungo.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*, yeCherry, yeGFP.

Financiamento: CNPq, CAPES e FAPERGS.