

Avaliação dos padrões de metilação no DNA do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em condições de infecção mimetizada

Augusto B. Penteriche¹, Augusto Schrank^{1,2}

¹ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; ² Rede Avançada em Biologia Computacional (RABICÓ);

Introdução

Metarhizium anisopliae é um fungo entomopatogênico com grande espectro de hospedeiros artrópodes. Dentre seus hospedeiros, diversos possuem importância social e econômica, como pragas de lavoura e vetores de doenças animais e humanas. O processo de infecção de *M. anisopliae* tem início com a adesão do esporo à cutícula do hospedeiro, seguindo pela germinação dos esporos em tubos germinativos, e a diferenciação destes em uma estrutura especializada denominada apressório, essencial para a penetração da cutícula do hospedeiro artrópode por meio de pressão mecânica e da secreção de diversas enzimas hidrolíticas que atuam sinergicamente.

Durante o ciclo de penetração e infecção de *M. anisopliae*, diversas mudanças no padrão de expressão gênica ocorrem para que a mesma seja bem sucedida. Dentre os diversos mecanismos de controle da expressão gênica, a metilação de citosinas no DNA é um importante passo de regulação em diversos organismos eucarióticos. A adição do grupamento metil a citosinas em regiões promotoras pode silenciar a transcrição do gene correspondente por bloqueio espacial da ligação de fatores de transcrição. Além disso, moléculas de DNA metiladas podem induzir o recrutamento de proteínas de remodelação da cromatina, compactando o *locus* e silenciando o(s) gene(s) correspondente(s). No entanto, o impacto e a importância da metilação gênica em fungos filamentosos ainda são pouco explorados. Assim, o presente trabalho visa explorar os padrões de metilação gênica de *M. anisopliae* a partir de uma condição de infecção mimetizada.

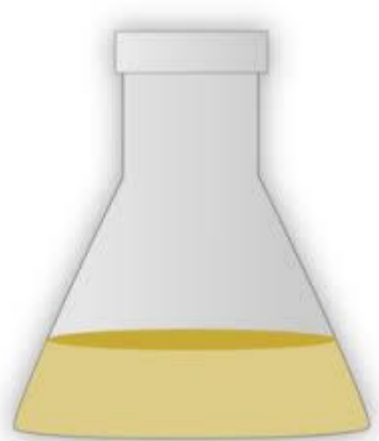
Para tanto, foi realizada uma análise comparativa do metiloma de *M. anisopliae* pelo sequenciamento por bissulfato de duas condições: *M. anisopliae* cultivado em meio rico (MCc, condição controle) líquido por 48 horas (h) e em meio sólido, por 48 h, contendo cutículas do carrapato-de-boi (*Rhipicephalus microplus*) como única fonte de carbono (condição que mimetiza a infecção). Os resultados indicaram que 96 genes apresentam um padrão de metilação diferencial nas condições de infecção mimetizada quando comparado ao meio rico, estando mais metilados no meio contendo cutículas.

Desses, foram escolhidos 5 genes com provável importância para o processo de infecção de *M. anisopliae* para serem analisados e os resultados confirmados por métodos complementares. Estes genes compreendem dois *backbone genes* envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários (destruxina, xenozoyenona-like), uma quitina sintase, uma endoglucanase e uma proteína colágeno-like. Além disso, buscou-se avaliar o padrão de expressão de duas metiltransferases encontradas no genoma de *M. anisopliae*. Para tal, o fungo foi cultivado em quatro condições diferentes: meio rico (MCc), cutículas de carrapato em meio sólido, cutículas de carrapato em meio líquido e cutículas de carrapato em meio líquido contendo o inibidor de metilação 5-azacitina, por 24 h, 48 h e 72 h. Destas amostras foram extraídos RNA (para qRT-PCR) e DNA (para BS-PCR).

Resultados

MCc líquido 48h

Cutículas em meio sólido 48h



X



96 genes metilados

Fig. 1: Análise de genes diferencialmente metilados em condição de infecção mimetizada. Foram identificados 96 genes diferencialmente metilados na condição de infecção mimetizada (cutículas em meio sólido). Desses, foram escolhidos 5 para serem avaliados por técnicas complementares.

Resultados

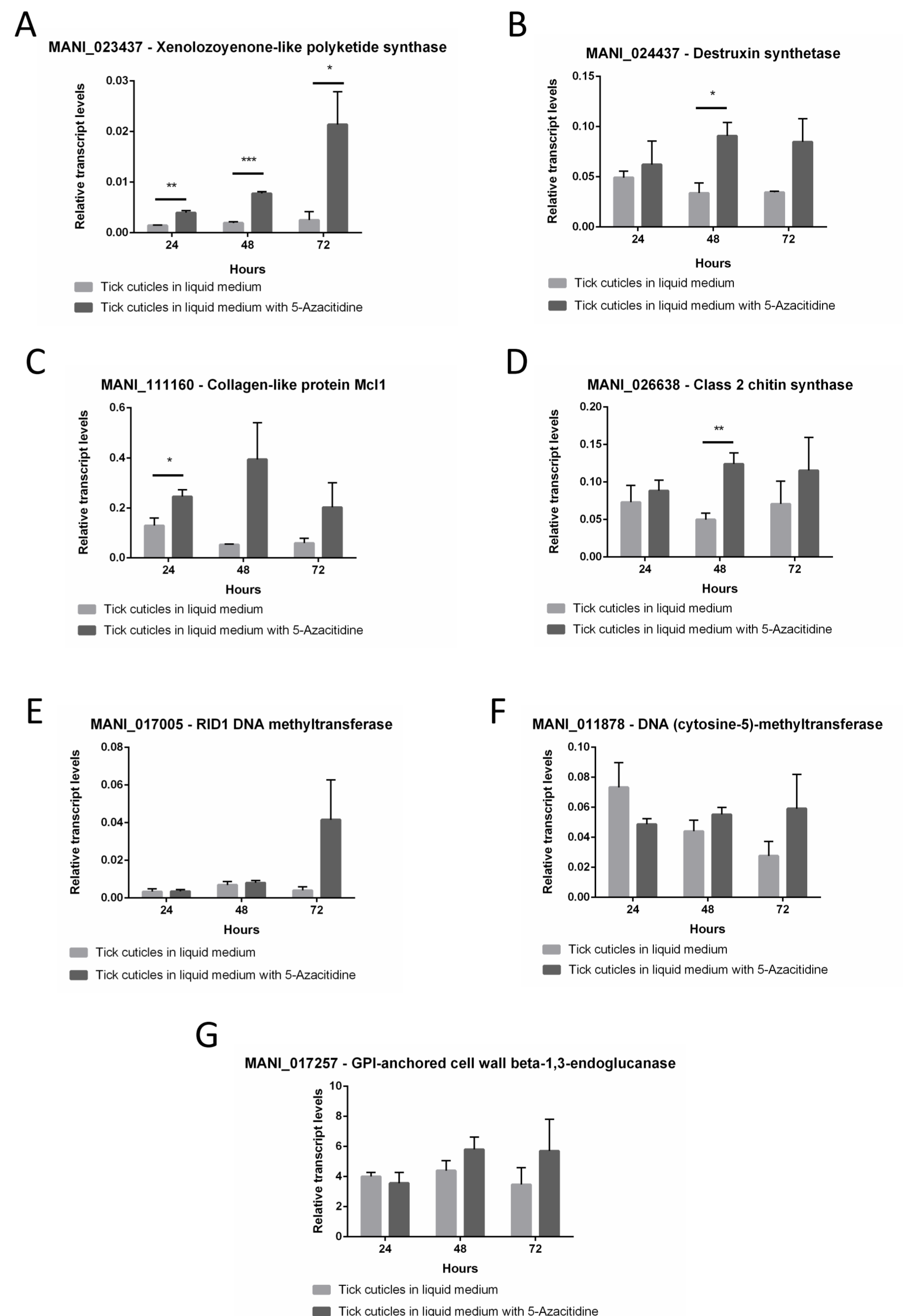
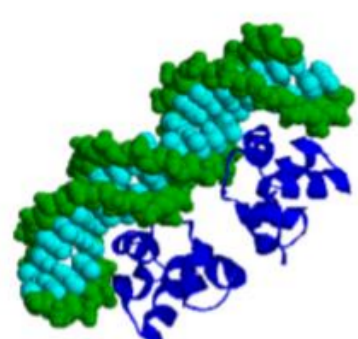
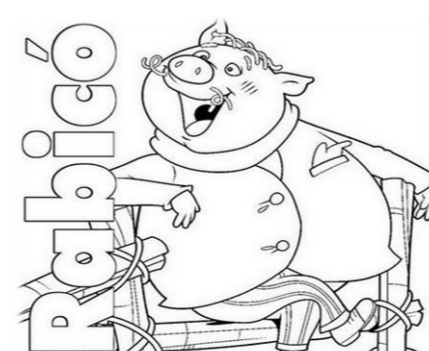


Fig. 2: Comparação do número relativo de transcritos por qRT-PCR dos genes selecionados. *M. anisopliae* foi cultivado em meio líquido contendo cutículas de carrapato-de-boi como única fonte de carbono, com e sem inibidor de DNA-metiltransferase 5-Azacitidina, por 24, 48 e 72 horas. As colunas representam a média + erro padrão do número relativo de transcritos dos genes (A) Policetídeo sintase xenozoyenona-like, (B) Destruxina sintetase, (C) Proteína colágeno-like, (D) Quitina sintase de classe II, (E) RID1 DNA metiltransferase, (F) C5 DNA metiltransferase e (G) β -1,3-endoglucanase obtidos por qRT-PCR. Foi aplicado um teste t não pareado às amostras. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$, *** $p \leq 0,0001$.

Apoio financeiro



Laboratório Nacional de Computação Científica



Conclusão

Os resultados mostram a expressão diferencial de genes que codificam para fatores de virulência entre a condição controle e na adição do inibidor de DNA metiltransferase (Fig. 2). Estes resultados indicam que a metilação desempenha papel importante no ciclo de vida de *M. anisopliae*. A metilação de genes essenciais para o sucesso da infecção, como fatores de virulência, se mostrou um tanto inusitada. Estes resultados, somados a resultados anteriores do grupo, sugerem que fatores de virulência são expressos imediatamente após o contato com o hospedeiro, sendo estes fatores putativamente regulados por componentes da cutícula. Quando sua expressão não é mais requerida, a metilação de bases do DNA atua realizando o *shutdown* destes genes energeticamente dispendiosos.