

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E
BIOTECNOLOGIA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO GENE QUE
CODIFICA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DO
FUNGO *Metarhizium anisopliae*

Leonardo Broetto

Trabalho de Conclusão apresentado
ao curso de Ciências Biológicas
como requisito para obtenção do
título de Bacharel em Ciências
Biológicas, Ênfase Molecular,
Celular e Funcional.

Orientação: Dr. Augusto Schrank

Porto Alegre, 2003

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Projeto financiado por recursos PADCTIII, FAPERGS, CNPq e bolsa PROPESQ.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos professores Augusto e Marilene pela orientação, oportunidade e confiança a min conferidos durante minha Iniciação Científica.

A Valéria e Luciano por tudo, sem eles a realização deste trabalho não teria sido possível.

A todos colegas do Centro de Biotecnologia, em especial aos dos laboratórios 205, 107, 210, que de maneira direta ou indireta participaram deste.

A todos amigos e familiares que me apoiaram, especialmente meus pais e irmão.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 A importância dos genes <i>gpd</i>	8
1.2 <i>Metarhizium anisopliae</i> e o controle biológico	20
1.3 RDA (Análise de Diferença Representacional)	23
1.4 Objetivos	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1 Organismos e Vetores	26
2.1.1 Linhagem de <i>Metarhizium anisopliae</i>	26
2.1.2 Cepas bacterianas	26
2.1.3 Vetores	26
2.2 Meios de cultura	26
2.2.1 Meio de Cove Completo (MCc)	27
2.2.2 Meio Luria-Bertani (LB)	28
2.2.3 Meio SOC	28
2.3 Antibióticos	29
2.4 Enzimas	29
2.5 Soluções e tampões	29
2.5.1 Solventes	29
2.5.2 Tampão de amostra para ácidos nucleicos	29
2.5.3 TAE	29
2.5.4 TEB (tris-borato) 10X	30
2.5.5 SSC 20X	30
2.5.6 Soluções e tampões utilizados em PCR	30
2.6 Géis de agarose	30
2.7 Procedimentos Experimentais	30
2.7.1 Cultivo e manutenção dos microorganismos	31
2.7.1.1 <i>Metarhizium anisopliae</i>	31
2.7.1.2 Cepas bacterianas	31
2.7.2 Transformação bacteriana por eletroporação	32
2.7.3 Manipulação de DNA e RNA	32
2.7.3.1 Extração de DNA plasmidial bacteriano em pequena escala	32

2.7.3.2 Extração de DNA de <i>Metarhizium anisopliae</i>	32
2.7.3.3 Extração de RNA de <i>Metarhizium anisopliae</i>	33
2.7.4 Reações de digestão de DNA	33
2.7.5 Clonagem de fragmentos de DNA	33
2.7.6 RDA (<u>R</u> andom <u>D</u> ifferential <u>A</u> mplification)	34
2.7.7 Construção da biblioteca genômica	37
2.7.8 Construção da biblioteca de DNA complementar (cDNA)	37
2.7.9 Preparo da sonda para procedimentos de hibridização	38
2.7.10 "Screening" de biblioteca genômica	38
2.7.11 Precipitação de partículas virais com PEG e extração de DNA viral	39
2.7.12 "Southern blot" e "Northern blot"	39
2.7.13 Reações de polimerização em cadeia (PCR) de DNA	40
2.7.14 Reação inversa de polimerização em cadeia (PCRi) de DNA	40
2.7.15 Sequenciamento e análise de DNA	41
3. RESULTADOS	43
3.1 Clonagem do gene <i>gpd</i> (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) de <i>M.anisopliae</i>	43
3.2 "Southern blot" do DNA genômico de <i>Metarhizium anisopliae</i>	45
3.3 "Screening" da biblioteca genômica de <i>Metarhizium anisopliae</i>	46
3.4 "Southern blot" dos clones λ <i>gpd</i> -A, λ <i>gpd</i> -B e λ <i>gpd</i> -E	46
3.5 Subclonagem do fragmento de DNA que corresponde ao gene <i>gpd</i> do clone λ <i>gpd</i> -B	47
3.6 Reação de Polimerização em Cadeia inversa com oligonucleotídeos específicos para a seqüência <i>gpd</i>	48
3.7 "Southern blot" do produto de PCRi com oligonucleotídeos para o gene <i>gpd</i>	48
3.8 Clonagem do produto de PCRi	49
3.9 PCR do banco de cDNA de <i>Metarhizium anisopliae</i>	49
3.10 Análise dos transcritos do gene <i>gpd</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i>	50
4. DISCUSSÃO	52
5. CONCLUSÕES	56

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
7. ANEXO	68

1. INTRODUÇÃO

O isolamento e a caracterização de genes de *Metarhizium* com expressão constitutiva e com regiões promotoras fortes fornecem uma série de ferramentas e possibilidades para o estudo da expressão gênica do fungo. O gene *gpd* que codifica para a enzima citosólica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) pode representar um importante alvo de estudo com esta finalidade, sendo um modelo utilizado em vários sistemas semelhantes. Contudo, o crescente número de trabalhos publicados demonstrando a regulação de genes *gpd* em fungos filamentosos, suscitaria tal regulação também em *Metarhizium anisopliae*. Da mesma forma, trabalhos recentes relatam a presença da enzima GAPDH, antes descrita como presente unicamente no citosol, com presença também na parede celular de fungos como *Saccharomyces cerevisiae* e ainda desempenhando funções diferentes das já relatadas e conhecidas em outros organismo e tipos celulares.

1.1. A importância dos genes *gpd*

Devido à utilização confusa de abreviaturas nos trabalhos científicos, um esclarecimento inicial quanto à nomenclatura e caracterização das enzimas codificadas pelos genes *gpd* e descritas na literatura, é de grande valia. Segundo o banco de dados relativo à nomenclatura de enzimas do Instituto de Bioinformática Suisso (SIB), "ExPASy (Expert Protein Analysis System) Proteomics Server", que se baseia primariamente nas recomendações do IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) e que descreve cada tipo de enzima caracterizada por um registro EC (Enzyme Commission), a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, corretamente abreviada por GAPDH, possui dois registros EC, consistindo então de duas enzimas diferentes. Ambos registros, 1.2.1.9 e 1.2.1.12, referem-se à enzimas GAPDH essenciais na rota catabólica da glicólise e da gliconeogênese que convertem o substrato gliceraldeído-3-fosfato à 1,3-difosfoglicerato (catalisando também a reação inversa), possuindo aparentemente funções idênticas. Entretanto, a enzima com EC 1.2.1.9 é dependente de NADP(+), liberando NADPH, enquanto que a GAPDH com EC 1.2.1.12 depende de um radical fosfato e NAD(+) para catalisar a reação, liberando NADH como subproduto (Figura 1). O erro de utilização de nomenclatura mais

freqüente nos trabalhos é a utilização da abreviatura GPD referindo-se à enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, ela se refere em realidade à enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.8), consistindo de uma enzima completamente diferente. Logo, a abreviatura descrita segundo as recomendações do Comitê de Nomenclatura Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, GAPDH, para as enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase será utilizada neste trabalho.

A reação catalisada pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é uma das mais importantes reações metabólicas da via glicolítica. Em *S. cerevisiae* e *Aspergillus nidulans*, a enzima GAPDH constitui mais de 5% do total das proteínas celulares solúveis (HIRANO *et al.*, 1999, REDKAR *et al.*, 1998). Um gene único codificando GAPDH foi clonado de *A. nidulans* (PUNT *et al.*, 1998) e três genes estruturais foram descobertos em levedura (MCALISTER & HOLLAND, 1985). Entretanto, cópias múltiplas de genes codificando GAPDH têm sido relatados apenas em eucariotos superiores (FORT *et al.*, 1985 e HANAUER *et al.*, 1984). Em plantas como o milho, quatro genes codificando GAPDH foram isolados e caracterizados (MANJUNATH *et al.*, 1997).

O isolamento e a caracterização parcial do gene *gpd* de *S. cerevisiae* revelaram algumas características de grande importância estrutural do gene, como sua multiplicidade de cópias, estimada em três cópias por genoma haplóide da levedura e o forte sinal para o início da sua transcrição (HOLLAND & HOLLAND, 1979 e 1980). O fato destes trabalhos, porém, se desenvolverem em um período em que as técnicas moleculares ainda não eram tão refinadas e abrangentes como hoje e que pouco se conhecia sobre a estrutura funcional e organizacional dos genes no que diz respeito ao conhecimento teórico, tornava confuso o entendimento da genética da expressão do gene, justamente pela pouca informação gerada até o momento. Entretanto, muito já se conhecia sobre a atividade da enzima GAPDH, como por exemplo, quando *S. cerevisiae* era cultivada em meios em altas concentrações de glicose, ou tinha seu desenvolvimento alternado entre meios sem e com glicose, verificava-se um grande aumento na atividade da enzima (MAITRA & LOBO, 1981). Isso levantava a hipótese de que os genes *gpd* de levedura eram induzíveis. Várias formas da enzima já eram descritas na época (LEBHERZ & RUTTER, 1967; HOLLAND & WESTHEAD, 1973), cerca de 13 formas eletroforéticamente e cromatograficamente separáveis já haviam sido relatadas.

Com o avanço dos trabalhos um volume muito grande de informação foi gerado e um grande avanço foi obtido na compreensão da regulação do gene *gpd*.

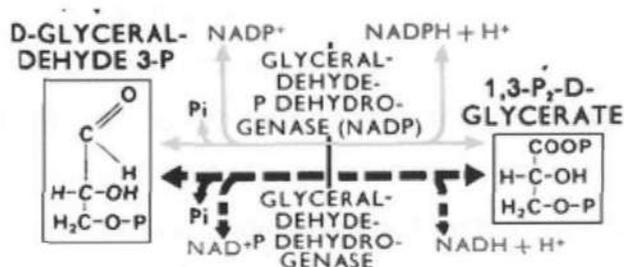


Figura 1. Reações catalisadas pelas duas enzimas GAPDHs. O retângulo à esquerda contém a fórmula estrutural simplificada da molécula de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. O retângulo à direita contém a fórmula estrutural simplificada da molécula de 1,3-difosfatoglicerato. As setas em cinza na metade superior da figura representam a reação catalisada pela enzima GAPDH EC 1.2.1.9. As setas pontilhadas pretas na metade inferior representam a reação catalisada pela enzima GAPDH EC 1.2.1.12.

Em muitos organismos eucarióticos os genes *gpd* são expressos constitutivamente e em altos níveis. As seqüências promotoras dos genes codificando GAPDH têm se mostrado úteis para a expressão eficiente de genes heterólogos em várias leveduras e fungos (HOLLAND & HOLLAND, 1978; BITTER e EGAN, 1984; WATERHAM *et al.*, 1997; HIRANO *et al.*, 2000). Com o objetivo de obter um promotor homólogo forte que permitisse a expressão heteróloga no fungo *Mucor circinelloides*, genes codificando para a proteína GAPDH foram clonados e a caracterização revelou três genes individuais (WOLFF e ARNAU, 2002), sendo que a região promotora de um deles, o gene *gpd1*, foi utilizada para a construção de um vetor de expressão. A expressão heteróloga do gene *crgA*, que codifica um regulador da biossíntese de caroteno, permitiu abolir a necessidade de luz para a produção de caroteno em *M. circinelloides* (NAVARRO *et al.*, 2000), WOLFF e ARNAU (2002) construíram um vetor ligando a região promotora de 740 pb do gene *gpd1* à *crgA* de modo a orientá-la em uma posição "upstream" em relação ao gene *crgA* selvagem. O plasmídeo resultante foi introduzido em *M. circinelloides* linhagem R7B e os transformantes foram incubados na ausência de luz, prevenindo assim a

expressão do gene *crgA* endógena induzida pelo desenvolvimento do fungo na presença de luz. Após três dias, os transformantes para a construção truncada do gene *crgA* apresentaram uma coloração amarelo-alaranjada, em contraste ao controle negativo (sem pigmentação), o que forneceu evidências de que a região promotora do gene *gpd1* realmente possibilitou a expressão do gene *crgA*, resultando na síntese de caroteno independente de luz no fungo.

Sistemas de transformação em fungos filamentosos baseiam-se, geralmente, em marcas auxotróficas para a seleção de transformantes. O uso de promotores fortes de genes homólogos, como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, facilita a expressão eficiente de genes repórter heterólogos como o gene que codifica para a resistência a higromicina B como marca de seleção em vários fungos (SCHUREN *et al.*, 1993). Em *Cryptococcus neoformans*, esforços para expressar tais genes heterólogos, mesmo com promotores homólogos como o do gene da actina, têm encontrado limitações desde que a técnica foi primariamente alcançada com o sorotipo A (COX *et al.*, 1996). O uso de promotores homólogos fortes permite a expressão eficiente de genes heterólogos em *C. neoformans*. Isso foi verificado pela utilização do gene *gpd* do fungo, que foi clonado partindo-se de regiões codificadoras altamente conservadas do gene cuja região promotora foi isolada e utilizada na construção de vetores de expressão. Tais vetores foram satisfatoriamente bem sucedidos em efetuar a complementação da mutação do gene nativo gene *ura5* ou para gerar resistência ao antibiótico higromicina B, conferida pelo gene heterólogo bacteriano *hphI* (VARMA & KWON-CHUNG, 1999).

Análises iniciais da região "upstream" do gene *gpdA* de *A. nidulans*, codificando a enzima GAPDH, revelaram a presença de várias seqüências envolvidas na expressão do gene (PUNT *et al.*, 1990). A análise por deleção identificou regiões à montante do gene envolvidas na iniciação da transcrição e na eficiência da transcrição, onde o elemento *gpd box*, foi identificado e descrito. Este elemento de 50 pb foi identificado por comparação de regiões "upstream" entre o gene *gpdA* de *A. nidulans* e *A. niger* (PUNT *et al.* 1990; PUNT & VAN DEN HONDEL, 1992) e sua deleção resultou na redução de duas à três vezes no nível de expressão do gene *gpdA* de *A. nidulans*. A introdução do elemento *gpd box* em outro promotor de um gene do fungo foi capaz de aumentar a expressão gênica. A fusão do elemento *gpd box* à região à montante do gene *amdS* resultou na orientação e em efeitos dependentes de posição no nível de expressão, o que sugeriu que o

elemento *gpd box* não consiste de um único elemento funcional, mas de dois ou mais, talvez sobrepostos.

Embora o gene *gpd* seja considerado um gene de expressão constitutiva em fungos filamentosos, existem precedentes para a regulação de *gpd* em outros organismos, por exemplo em vertebrados (DOBSON *et al.*, 1987), no inseto *Drosophila* (SUN *et al.* 1988) e no verme *Caenorhabditis elegans* (HUANG *et al.*, 1989).

Estudos sobre uma característica importante do fungo *Trichoderma harzianum*, sua resposta à luz, revelaram que o gene *gpd* é reprimido durante a conidiação e durante o micoparasitismo. Sob total ausência de luz, *T. harzianum* se desenvolve indefinidamente como micélio, desde de que os nutrientes não sejam limitantes. Um breve pulso de luz azul, assim como a limitação de nutrientes, induz a esporulação (PUYESKY *et al.*, 1997). ADAM & TIMBERLAKE (1990) mostraram que a expressão constitutiva do gene *brlA* em *A. nidulans*, cultivado em condições favoráveis induzia a esporulação, ocorrendo também a repressão de dois genes que são normalmente, altamente expressos, os genes *alcA* e *aldA*. Estes autores propuseram que a indução da esporulação leva a um bloqueio metabólico generalizado. *T. harzianum*, quando exposto à luz azul, comporta-se de uma maneira semelhante. A colônia esporula, mesmo que as condições nutricionais sejam favoráveis. Durante o micoparasitismo, assim como na conidiação, o organismo deve sobreviver a uma condição menos favorável. Poderia se argumentar que a repressão do gene *gpd* seria simplesmente o resultado de uma desaceleração no desenvolvimento do fungo. Este não seria o caso no trabalho de Puyesky *et al.* (1997), supracitado, onde a baixa expressão ("down-regulation") inicia cedo no desenvolvimento da colônia e continua enquanto os conidióforos estão se desenvolvendo mais rapidamente. Em 24 horas após a indução o desenvolvimento é lento, os conídeos estão maturando e os níveis de mRNA do gene *gpd* são muito baixos.

Esporos dormentes do fungo *Phycomyces blakesleeana*s contém uma proteína de 37kDa que é endogenamente mono-ADP-ribosilada. Esta proteína foi purificada e identificada como sendo uma gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) por seqüenciamento da região N-terminal e análise de sua homologia. A atividade enzimática de GAPDH altera-se dramaticamente na fase de germinação do esporo, sendo máxima em estágios onde a atividade de ribosilação por ADP é quase

indetectável. A presença de gliceraldeído-3-fosfato nessa reação afeta a [³²P]ADP-ribosilação de GAPDH. A ribosilação por ADP de GAPDH ocorre por transferência de ADP-ribose de NAD para um resíduo de arginina. Um modelo para a regulação da atividade de GAPDH e sua função na germinação dos esporos é sugerido para *P. blakesleeanus*, onde o gene *gpd* seria, então, negativamente regulado por ribosilação por ADP (DEVEZE-ALVAREZ *et al.*, 2001).

Células de *S. cerevisiae* cultivadas em um meio com limitação de nutrientes retomam rapidamente o desenvolvimento proliferativo quando transferidas para um meio contendo glicose. Isto é precedido por um rápido aumento nos níveis de mRNAs dos genes *CLN3*, *BCK2* e *CDC28*, que codificam proteínas de regulação do ciclo celular e que promovem o progresso através do início do desenvolvimento. Em um experimento utilizando iodoacetato, um inibidor da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase envolvida na via glicolítica da levedura, se evidenciou a relação de regulação do gene *gpd* mediada pela presença de glicose, devido a utilização da droga, indiretamente pela inibição da enzima GAPDH, capaz de baixar o nível de expressão dos genes *CLN3*, *BCK2* e *CDC28* (NEWCOMB *et al.*, 2003). A glicose é conhecida por afetar uma série de processos celulares em *S. cerevisiae*, incluindo a repressão de genes necessários para o desenvolvimento em fontes alternativas de carbono e a indução de genes necessários para o transporte de glicose (CARLSON, 1999; GANCEDO, 1998; JOHNSTON, 1999; WARNER, 1999). Em um trabalho pioneiro de análise global da expressão gênica (“*microarray*”) utilizando cDNA, DERISI *et al.* (ano), demonstraram que cerca de 2.000 genes são regulados pela mudança de um desenvolvimento fermentativo em glicose para um desenvolvimento oxidativo em outras fontes de carbono (DERISI *et al.*, 1997). Muitas mudanças esperadas na expressão gênica foram observadas nesse experimento: genes codificando enzimas envolvidas na via glicolítica apresentaram baixa expressão quando a glicose do meio era exaurida, enquanto que a expressão de genes envolvidos no metabolismo oxidativo aumentava.

Homólogos do gene *gpdA* têm se mostrado ritmicamente expressos em vários organismos (FAGAN *et al.*, 1999; TEMME *et al.*, 2000), incluindo o fungo *Neurospora crassa* (SHINOHARA *et al.*, 1998). Investigando uma possível ritmicidade circadiana em *A. nidulans*, GREENE *et al.* (2003), isolaram RNA de culturas de linhagem selvagem cultivadas em luz constante por um dia que então foram transferidas para escuridão constante e coletadas para extração de RNA em intervalos de 4 horas por

dois dias consecutivos. O RNA total foi submetido à hibridização com o gene *gpdA* de *A. nidulans* e se observou um ritmo na acumulação dos transcritos de *gpdA* obtidos no período de 28 a 32 horas. Da mesma forma que a variabilidade observada nos experimentos no tempo de pico de acumulação de mRNA para os genes "clock-controlled" (genes regulados pelo ciclo circadiano) em *N. crassa*, a fase de ritmo da expressão do gene *gpdA* em *A. nidulans*, pode ter uma variação superior a 8 horas em experimentos separados. Esses dados levaram os autores a sugerir a existência de um ritmo circadiano funcional em *A. nidulans* com um período sob condições constantes ("free-running period") semelhante ao já descrito em *A. flavus*. Na tentativa de determinar se este ritmo poderia ser reajustado, experimentando o processo de "entrainment", onde o ritmo tem a propriedade de ser zerado, ou melhor reajustado, pela exposição a sinais externos, tais como a luz do dia e ciclos de temperatura, o ritmo do gene *gpdA* foi examinado em amostras de *Aspergillus* cultivadas em ciclos de 12 horas de luz à 38°C e 12 horas de escuridão à 30°C. Ciclos de luz e temperatura foram utilizados simultaneamente porque nem a luz, nem a temperatura, sozinhos, são suficientes para reajustar o ritmo circadiano. Neste ciclo o ritmo de expressão do gene *gpdA* entrou em processo de "entrainment" em um período de 24 horas, com picos de mRNA ocorrendo no final da fase de frio e escuridão. Com isso, os autores sugerem que a existência de um ritmo circadiano no fungo *A. nidulans* é apoiada nos experimentos demonstrando a existência de um ritmo corrido e passível de "entrainment" na acumulação dos transcritos do gene *gpdA* (GREENE *et al.*, 2003). O processo de "entrainment" consiste na percepção de pistas temporais externas ("zeitgebers") por um ou mais "componentes relógio" ("clock components") e mudança do ritmo circadiano para uma fase apropriada àquela situação. A magnitude e o direcionamento da mudança na fase depende da intensidade e duração do "zeitgeber" e da fase na qual o ritmo circadiano do organismo exposto se encontra quando o pulso ou variação é dado (ASCHOFF, 1981; BRUCE, 1960).

De forma muito semelhante este controle circadiano ocorre também no fungo *N. crassa*, como já citado. O gene *ccg-7* ("clock-controlled gene"), que codifica GAPDH em *N. crassa*, é um gene regulado pelo ritmo circadiano que codifica um produto importante do metabolismo basal e que desempenha uma função encontrada em muitos dos organismos vivos, tal fato foi evidenciado por SHINOHARA *et al.* (1998) através da análise de seqüências e da análise funcional

do gene *ccg-7*. Embora numerosos genes *ccg* tenham sido relacionados à comportamentos específicos de cada organismo tais quais a fotossíntese (KAY, 1993), aspectos do desenvolvimento (BELL-PEDERSEN *et al.*, 1996) ou reprodução animal (FOULKES *et al.*, 1996; BERNARD *et al.*, 1997), SHINOHARA *et al.* (1998) demonstram um exemplo de gene regulado pelo ritmo circadiano que participa num aspecto do metabolismo fundamental e que é comum a muitos organismos. A ritmicidade circadiana foi observada tanto para os níveis de mRNA de *ccg-7* como para os níveis de atividade de GAPDH, sob condições constantes na ausência de luz. Os dados indicaram uma amplitude de 4 a 8 vezes no ritmo de mRNA de *ccg-7* e uma baixa amplitude no ritmo de atividade de GAPDH, o que é consistente com a presença de fatores adicionais pós-transcricionais e/ou pós-traducionais afetando a expressão da atividade enzimática. Um ritmo na atividade de GAPDH foi sugerido por um estudo anterior (HOCHBERG *et al.*, 1974) em culturas desenvolvendo-se em meio sólido onde o desenvolvimento circadiano (conidiação) ocorria. Embora a presença de desenvolvimento regulado pelo ritmo circadiano pareça estar refletindo o ritmo em desenvolvimento e em acumulação de massa, os dados mostram que os níveis de mRNA de GAPDH e sua atividade enzimática são influenciados pelo ritmo circadiano. Assim, o gene *ccg-7* parece não ser regulado pelo desenvolvimento do fungo e o gene também não é induzido por fatores ambientais como choque térmico, estresse osmótico ou privação de carbono/nitrogênio. Realmente, os níveis de mRNA de *ccg-7*, em geral, são refratários a mudanças, exceto para as modulações causadas pelo relógio biológico.

A regulação de GAPDH pelo ritmo circadiano é particularmente interessante em decorrência do crescente número de trabalhos considerando funções não glicolíticas para os polipeptídeos de GAPDH. Estes incluem (i) reparo de DNA (MEYER-SIEGLER *et al.*, 1991; MANSUR *et al.*, 1993; BAXI *et al.*, 1995); (ii) ligação ao DNA, ao mRNA e a proteínas (RONAI, 1993; BURKE *et al.*, 1996); (iii) uma possível função na exportação de RNA (SINGH *et al.*, 1993); (iv) controle traducional (SUGAHARA *et al.*, 1995); (v) atividade proteína-quinase (KAWAMOTO *et al.*, 1986); (vi) interação com microtúbulos (HUITOTEL *et al.*, 1985); (vii) interações com membranas celulares (ALLEN *et al.*, 1987); (viii) apoptose, (ix) desordens neuronais, (x) patogênese viral, (xi) câncer de prostata, (xii) endocitose, (xiii) estresse por NO e (xiv) replicação de DNA (SIROVER, 1999). Enquanto estas atividades foram relatadas principalmente para GAPDHs de mamíferos, tais funções para a proteína

em eucariotos inferiores não podem ser excluídas *a priori* considerando-se o alto grau de conservação das seqüências de GAPDH entre estes organismos.

Os dados de ritmicidade de mRNA do gene *ccg-7* do fungo *N. crassa*, unidos a outros dados de expressão de GAPDH, poderiam aumentar as questões acerca do seu uso como controle interno para a normalização de experimentos de expressão. Por exemplo, mRNA de GAPDH de *Aspergillus*, é osmoticamente induzido, embora este não seja o caso para o gene *ccg-7*. Em outros sistemas, os níveis de mRNA dos genes GAPDH são responsivos a agentes patogênicos ou citotóxicos. Por exemplo, em batata, os níveis de mRNA de GAPDH são conhecidos por serem induzidos por infecções com o fungo *Phytophthora* (LAXALT *et al.*, 1996). Em culturas de queratinócitos humanos, a droga tetra-cloro-dibenzeno-p-dioxina, é conhecida por sua atividade pleiotrópica elicitora tóxica, induzindo os níveis de mRNA de GAPDH (MCNULTY *et al.*, 1995). Outros trabalhos com genes GAPDH de mamíferos também sugerem que eles têm expressão constitutiva (QUAIL *et al.*, 1995; NESS *et al.*, 1991). Desde que a enzima GAPDH desempenha um papel importante na via glicolítica e outros tantos em funções não glicolíticas, como em muitos dos casos supracitados, mudanças na atividade de GAPDH podem influenciar muitas outras atividades celulares e desta forma facilitar a adaptação à diferentes desafios ou condições de desenvolvimento. O alto grau de conservação das seqüências de GAPDH indica que todas as variantes modernas da enzima surgiram de uma única proteína ancestral comum (MARTINEZ *et al.*, 1989). Talvez, em adição ao fato das enzimas GAPDH compartilharem um ancestral comum, as GAPDHs modernas compartilham o aspecto comum de regulação por um "timekeeper" interno.

Muitos organismos durante seus ciclos de vida são confrontados com numerosos estresses ambientais que afetam a sua sobrevivência. Muitos genes que medeiam respostas à desidratação, à altas concentrações de sal e à altas ou baixas temperaturas têm sido caracterizados. Acredita-se que as proteínas codificadas por esses genes desempenham funções de proteção da célula que sofre estes estresses. O choque térmico e o estresse anaeróbico são conhecidos por alterarem a expressão de genes da via glicolítica, sugerindo que o metabolismo primário do carbono é uma das vias que respondem a mudanças nas condições ambientais. Entre estes, o gene *gpd*, para todos os tipos de organismos, incluindo plantas, micróbios e animais, é conhecido por responder aos estresses térmico e anaeróbico.

A ativação do gene *gpd* sob tais estresses, talvez seja uma resposta adaptativa ao dano mitocondrial induzindo a inibição da fosforilação oxidativa. *A. nidulans* acumula glicerol como osmólito compatível e exibe expressão induzida do gene *gpd* em culturas adaptadas a altas concentrações de sal (JEONG *et al.*, 2000).

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) tem sido considerada uma proteína citosólica glicolítica clássica; entretanto, evidências recentes demonstram que em mamíferos apresentam variadas atividades de localização sub-celular diversa que não estão relacionadas à glicólise (SIROVER, 1997, 1999). Em muitas espécies de microrganismos, incluindo bactérias e leveduras, e no helminto patogênico *Schistosoma mansoni*, GAPDH tem sido descrita na superfície celular, onde pode desempenhar diferentes funções. GAPDH da superfície celular de *S. mansoni* tem sido associada à resistência humana a esquistossomíase (CHARRIER-FERRARA *et al.*, 1992; GOUDOT-CROZEL *et al.*, 1989). No grupo *Streptococcus* A e em *Staphylococcus aureus* uma GAPDH de superfície celular está envolvida nas interações com as células hospedeiras (MODUN & WILLIAMS, 1999; PANCHOLI & FISCHETTI, 1992, 1993, 1997; WINRAM & LOTTENBERG, 1996, 1998). Microrganismos eucarióticos também contêm uma GAPDH associada à parede celular; na levedura *Kluyveromyces marxianus* a flocculação celular depende da expressão de uma GAPDH de superfície celular (FALCÃO MOREIRA *et al.*, 1998; FERNANDES *et al.*, 1992). Existe a demonstração de que uma GAPDH imunogênica associada à parede celular foi encontrada na superfície celular da levedura patogênica *Candida albicans* na sua forma ativa (GIL-NAVARRO *et al.*, 1997). Linhagens clínicas de *C. albicans* expressam este antígeno de superfície celular tanto "in vitro" com em tecidos infectados (GIL *et al.*, 1999) e, desde que GAPDH de *C. albicans* também foi encontrada como uma proteína que se liga à fibronectina e à laminina, a GAPDH de superfície celular poderia então participar na adesão das células fúngicas aos tecidos hospedeiros, desempenhando assim uma importante função na virulência (GOZALBO *et al.*, 1998; VILLAMÓN *et al.*, 1999).

Por microscopia imunoeletrônica com o antisoro policlonal contra a enzima citosólica e glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *C. albicans* (anti-GAPDH PAb), a proteína foi claramente detectada na superfície externa da parede celular, particularmente no blastoconídeo, assim como no citoplasma. A análise de fluxo citométrico semi-quantitativa com o antisoro anti-GAPDH PAb mostrou uma

diminuição na ligação do antisoro às células hospedeiras na presença de fibronectina e lâminina solúveis. Além disso, a enzima citosólica GAPDH purificada foi encontrada ligando-se à fibronectina e a lâminina em um "western blot" de ligação. Estas observações sugerem que a forma da GAPDH associada à parede celular em *C. albicans* estaria mediando a adesão das células fúngicas à fibronectina e a lâminina, contribuindo assim para ligação do microrganismo ao tecido hospedeiro propiciando a disseminação da infecção (GOZALBO *et al.*, 1998). A adesão de *C. albicans* a tecidos hospedeiros parece ser um fator essencial para o estabelecimento da candidíase. A adesão pode envolver a ligação entre moléculas complementares tanto na superfície celular do hospedeiro como na superfície do patógeno. O estabelecimento de locais de metástases de infecção pelo corpo, na candidíase disseminada, provavelmente ocorre depois da aderência da levedura à membrana basal do endotélio e/ou à matriz extracelular sub-endotelial. A aderência aos componentes da matriz extracelular, desta forma, representa um passo crucial no desenvolvimento da candidíase. A habilidade de linhagens de *C. albicans* de ligarem-se a proteínas da matriz extracelular correlaciona-se à sua ordenação em uma classificação da sua patogenicidade, sugerindo que a aderência à componentes da matriz extracelular constitui um fator de virulência importante (CALDERONE & BRAUN, 1991; CUTLER, 1991; KLOTZ, 1994). *C. albicans* é conhecida por ligar-se à diferentes proteínas da matriz extracelular tais como fibronectina, lâminina, entactina e colágeno e estas proteínas estão implicadas como possíveis moléculas alvo quando ocorre a disseminação do microrganismo (CALDERONE, 1993; CHAFFIN *et al.*, 1997; FUKAZAWA *et al.*, 1997; HOSTETTER, 1994; KLOTZ, 1994; PENDRAK *et al.*, 1995). Embora um número considerável de moléculas, com características semelhantes à de receptor, implicadas na ligação à fibronectina e à lâminina tenham sido descritas para *C. albicans* (BOUCHARA *et al.*, 1990; GAUR *et al.*, 1997; KLOTZ *et al.*, 1994 e 1993; LÓPEZ-RIBOT *et al.*, 1994; NÈGRE *et al.*, 1994; SANTONI *et al.*, 1994 e 1995), os mecanismos moleculares envolvidos nesta interação de adesão permanecem indefinidos. A compreensão dos mecanismos mediando a aderência de *C. albicans* à matriz extracelular ou a células hospedeiras pode levar ao desenvolvimento de agentes antifúngicos cujo mecanismo de ação seria de competição com ligantes endógenos para a ligação à receptores do patógeno ou adesinas. Estes inibidores poderiam prevenir a adesão aos tecidos do hospedeiro e desta forma prevenir infecções invasivas. O "screening" da biblioteca de cDNA para

seqüências que codificam proteínas imunogênicas, a partir do uso de soro coletado de pacientes com alta quantidade de anticorpos anti-*C. albicans*, foi feito para a identificação de antígenos potencialmente úteis para o diagnóstico de candidíase ou que desempenhassem alguma função no processo de infecção. Usando esta abordagem, o gene completo, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, foi isolado e foi demonstrado que, além da sua localização citoplasmática, uma forma imunogênica e enzimaticamente ativa, da enzima glicolítica, associada à parede celular foi encontrada na superfície celular de *C. albicans* (GIL-NAVARRO *et al.*, 1997).

A enzima glicolítica GAPDH de *S. cerevisiae*, previamente descrita como restrita ao interior celular, está presente também na parede celular (DELGADO *et al.*, 2001). A atividade da enzima, proporcionalmente ao número celular e ao tempo de incubação, foi detectada em células de levedura de linhagens selvagem intactas. Células intactas de levedura contendo mutações por inserções em cada um dos três genes estruturais *TDH* (*tdh1*, *tdh2* e *tdh3*) e mutantes duplos (*tdh1 tdh2* e *tdh1 tdh3*) também demonstram uma atividade de GAPDH associada à parede celular. A localização de GAPDH na parede celular foi confirmada no tipo selvagem e nos mutantes *tdh* por imunofluorescência indireta e por análise de fluxo citométrico com a utilização de um antisoro policlonal contra GAPDH de *S. cerevisiae*. Por microscopia imunoeletrônica, a proteína GAPDH foi detectada na superfície externa da parede celular de células do tipo selvagem assim como no citoplasma. Análises por "Western immunoblot" do extrato da parede celular e do citosol mostraram que os polipeptídeos TDH2 e TDH3 estão presentes na parede celular, assim como no citosol de células em fase exponencial. TDH1 foi detectada apenas em células na fase estacionária, da mesma forma no citosol e no extrato de parede celular. Os resultados deste trabalho incorporam GAPDH de *S. cerevisiae*, codificada por *tdh1-3*, em uma nova família multifuncional de GAPDHs associadas à parede celular que retêm seu domínio catalítico (DELGADO *et al.*, 2001).

A baixa-expressão ("down-regulation") do gene *gpd* poderia ter conseqüências para o uso de sinais de expressão de *gpd* dirigindo genes marcadores dominantes de seleção, tal como a higromicina fosfostransferase (PUNT *et al.*, 1987). É freqüentemente observado que a higromicina inibe a esporulação de transformantes em outros aspectos resistentes à droga. A esporulação é inibida em certas condições que permitem o desenvolvimento celular. Por exemplo limitações de nutrientes em auxotróficos (HORWITZ & GRESSEL, 1983; SERLUPI-

CRESCENZI *et al.*, 1983). Entretanto, experimentos preliminares indicaram que o promotor de *gpd* de *A. nidulans* confere altos níveis de mRNA do gene *hph* em conidióforos enquanto os níveis de mRNA de *gpd* de *Trichoderma* diminuem acentuadamente. Assim, a baixa expressão (“*down-regulation*”) não importaria dificuldades em se usar o promotor de *gpd* para expressar genes heterólogos em conidióforos e conídios, embora mais trabalhos sejam necessários para esclarecer esta questão.

1.2. *Metarhizium anisopliae* e o controle biológico

O controle biológico é uma alternativa viável para o combate de pragas e patógenos e vantajosa em relação ao controle químico, especialmente quanto ao impacto ambiental, ao custo, à especificidade e ao desenvolvimento de resistência. O fungo *Metarhizium anisopliae* é considerado um dos organismos mais promissores no controle de carrapatos e de insetos praga da agricultura e tem sido um dos modelos mais estudados em relação ao isolamento, seleção e caracterização de linhagens do ambiente, elucidação dos mecanismos de infecção e no desenvolvimento de formulações de biopesticidas. O maior entrave para a utilização de fungos no controle biológico é o maior tempo necessário entre a aplicação e a morte dos hospedeiros, em comparação aos pesticidas químicos. Portanto, um dos objetivos comuns é aumentar a velocidade de morte dos hospedeiros. O entendimento das características básicas da relação entre o fungo e o hospedeiro tem permitido o conhecimento da natureza da sua patogenicidade, possibilitando a introdução de genes específicos, altamente expressos em condições de infectividade, visando acelerar o processo de infecção, diminuindo, assim, o tempo entre o início da infecção e a morte do hospedeiro (ST. LEGER *et al.*, 1996).

O fungo filamentoso entomopatógeno e acaricida *Metarhizium anisopliae* pertence à classe Moniliales, família Moniliaceae e foi descrito pela primeira vez na literatura por METSCHNIKOFF, Rússia 1879, parasitando larvas do besouro-do-grão-do-trigo (*Anisopliae austriaca*; ALVES, 1998); TULLOCH (1976) revisou a taxonomia do gênero *Metarhizium* e manteve duas espécies: *Metarhizium flavoride* e *Metarhizium anisopliae*; a última apresentando duas variedades, a *anisopliae minus* e a *anisopliae majus*. DRIVER *et al.* (2000) reconheceram três espécies para

Metarhizium: *Metarhizium anisopliae*, variedades *anisopliae*, *majus*, *lepidotum* e *acidum*; *Metarhizium flavoridae*, variedades *flavoride*, *minus*, *novazealandicum* e *pemphigum*; e *Metarhizium album*.

A espécie *M. anisopliae* apresenta micélio hialino e septado. Os conídios são geralmente uninucleados e cilíndricos. São conhecidas duas formas de reprodução: a reprodução assexuada, responsável pelo crescimento vegetativo do fungo e a reprodução parassexuada, que envolve os fenômenos de heterocariose e de recombinação mitótica.

M. anisopliae infecta mais de 300 espécies de insetos. Alguns de seus hospedeiros são pragas da agricultura, como a cigarrinha da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*), a cigarrinha-das-pastagens (*Deois sp* e *Zulia sp*), a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*), a formiga saúva (*Atta sexdens*), os térmitas subterrâneos (*Isoptera rhinotermitidae*), entre outros. Sua patogenicidade tem sido demonstrada ainda para alguns vetores de doenças humanas (SILVA & MESSIAS, 1986; SHERLOCK & GUITON, 1992) e para carrapatos de diferentes gêneros e espécies (KAAYA *et al.*, 1996; ZHIOUA *et al.* 1997; CORREIA *et al.*, 1998; FRAZON *et al.*, 2000). Vários fatores têm sido apontados como possíveis determinantes da patogenicidade, entre os quais, a produção de toxinas e a produção e secreção de enzimas hidrolíticas, como proteases, quitinases e lipases (CLARKSON & CHARNLEY, 1996). Alguns autores sugerem ainda que a expressão diferenciada das superóxido-dismutases (SODs), enzimas que atuam como um sistema de defesa contra radicais livres de oxigênio (SCHRANK *et al.*, 1993; BITTENCOURT, 1998), e a presença de micovírus com genoma de dsRNA (BOGO *et al.* 1996) influenciam a patogenicidade de *M. anisopliae*. São necessárias, entretanto, confirmações experimentais para estas observações.

Por ser considerado um dos agentes mais promissores no controle de pragas *M. anisopliae* tem sido um dos modelos mais estudados em relação ao isolamento e à seleção de linhagens no ambiente, ao isolamento de mutantes com características importantes para o controle biológico, ao estudo dos mecanismos de infecção, ao desenvolvimento de metodologias de biologia molecular e a estudos alternativos para a produção, a manutenção da viabilidade e a formulação de biopesticidas.

M. anisopliae infecta seus hospedeiros em fases sucessivas de germinação, diferenciação, penetração, colonização, reprodução e disseminação (SCHRANK *et al.*, 1993; ALVES, 1998). O processo é iniciado pela germinação dos esporos sobre

a cutícula do inseto, mas este processo pode ser inibido por altas temperaturas, que impedem o desenvolvimento do fungo e até mesmo, pode causar a sua morte. Na superfície do esporo, ainda não germinado, foi detectada a presença de enzimas (proteases, esterasas, e N-acetilglicosidasas) que têm efeito na adesão, na aquisição preliminar de nutrientes e que também causam modificações superficiais nas camadas mais externas da cutícula do hospedeiro (ST. LEGER *et al.*, 1990). O esporo germina e o tubo germinativo se diferencia por dilatação da extremidade das hifas para a formação do apressório, uma estrutura especializada de penetração, que também estabelece a relação nutricional como o hospedeiro, estimulada pelo contato físico com a cutícula do hospedeiro (ST. LEGER *et al.*, 1991, 1989). Esse estímulo também é sensível a alterações da superfície, indicando um possível mecanismo pelo qual o patógeno reconhece seu hospedeiro (ST. LEGER *et al.*, 1990).

Após a formação do apressório, ocorre o desenvolvimento de estruturas denominadas grampos de penetração, que são caracterizadas por uma alteração na parede celular da parte do apressório que está em contato com o hospedeiro, sendo mais fina e saliente (ST. LEGER *et al.*, 1991). Evidências obtidas por microscopia eletrônica e histoquímica sugerem que a etapa de penetração ocorre por uma combinação de degradação enzimática e pressão mecânica (ST. LEGER *et al.*, 1988). Depressões rasas observadas, algumas vezes, no ponto de penetração, indicando a pressão física e zonas de lesão tecidual, indicando digestão enzimática da cutícula, também evidenciam esta combinação (BIDOCHKA *et al.*, 1997). Nesse processo são produzidas algumas enzimas como proteases, quitinases e lipases (KUCERA, 1980; ST. LEGER *et al.*, 1986, 1988, 1991; PINTO *et al.*, 1996; ALVES, 1998). Após o processo de penetração, o fungo inicia a etapa de colonização do hospedeiro. As hifas sofrem um engrossamento e se ramificam inicialmente no tegumento e posteriormente na cavidade geral do corpo, liberando toxinas e ocasionando a morte do hospedeiro devido à produção de metabólitos secundários denominados destruxinas, que afetam os canais de transporte de íons, envolvidos na resposta muscular e na integridade da membrana celular. O hospedeiro exhibe vários sintomas, incluindo inquietação, perda de coordenação e parada da ingestão de alimento. A destruxina é uma toxina ciclodepsipetídica com várias atividades inseticidas, cuja produção foi detectada em certas linhagens de *Metarhizium*, podendo ser importante na determinação da virulência e da especificidade do fungo

pelo hospedeiro. Foram detectadas quantidades diferentes de destruxinas A, B e E em diferentes linhagens de *Metarhizium*, sendo a destruxina A predominante. Linhagens muito virulentas produzem grandes quantidades de destruxinas, mas linhagens que produzem pouca toxina são também virulentas, sugerindo que as destruxinas não os únicos determinantes da patogenicidade (AMIRI, 2000). Estudos da toxicidade e da patogenicidade das destruxinas de *M. anisopliae* não mostram efeito tóxico em testes com mamíferos. Estes dados sustentam a idéia da especificidade da toxina ao hospedeiro.

Após a morte do hospedeiro, que ocorre de quatro a cinco dias após a infecção, as hifas se desenvolvem invadindo os diversos órgãos internos. Após o esgotamento dos nutrientes, as hifas se estendem para fora do corpo do hospedeiro, formando um micélio que recobre a superfície do tegumento, resultando no que se chama de "mumificação". O tempo de colonização pode variar de 76 a 120 horas, dependendo do hospedeiro e das condições ambientais. Em condições ambientais apropriadas, ocorre a produção de esporos que poderão ser disseminados para infecção de outros indivíduos. A grande variabilidade genética que apresenta esta espécie de fungo resulta no aparecimento de muitas linhagens com diferentes graus de virulência, especificidade, produção de conídios e resistência a luz ultra-violeta (ALVES, 1998). A entomopatogenicidade de *M. anisopliae* é dependente de um relacionamento complexo entre a capacidade do fungo para germinar e penetrar na cutícula e a capacidade do hospedeiro em evitar o desenvolvimento do fungo.

O fungo filamentoso entomopatógeno e acaricida, *Metarhizium anisopliae*, possui grande potencial como agente de controle biológico, sendo utilizado para o controle de pragas da agricultura, da pecuária e mais recentemente de insetos do ambiente doméstico, possibilitando assim uma alternativa aos pesticidas químicos com uma série de vantagens.

1.3. RDA (Análise de Diferença Representacional)

Pelo fato do isolamento da seqüência parcial do gene *gpd* de *Metarhizium anisopliae*, utilizada no presente trabalho, ter sido obtida através da técnica de RDA desenvolvida previamente no laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos do Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia da UFRGS (DUTRA *et al.*, dados não publicados), observo aqui a importância de abranger o

assunto, assim como de reservar um espaço para a descrição mais detida da metodologia em Matérias e Métodos, com a finalidade de alcançar um maior esclarecimento do funcionamento e do potencial da técnica.

Nos anos mais recentes várias técnicas têm sido desenvolvidas para estudar as diferenças de expressão gênica em organismos e na identificação de genes envolvidos nesses processos (WADA *et al.*, 1997). Essas metodologias são importantes na detecção de alterações na expressão do mRNA por enriquecimento seletivo sem no entanto, ser necessário conhecimento prévio das seqüências específicas dos genes em questão, o que permite a descoberta de novos genes. A determinação das diferenças existentes entre grupos estreitamente relacionados contribui para o entendimento da complexidade dos eventos metabólicos e bioquímicos (HUBANK & SCHATZ, 1994). Os métodos mais utilizados para clonar genes diferentemente expressos foram desenvolvidos para amplificar e isolar seqüências de ácidos nucléicos presentes em uma amostra e ausentes ou expressas em menor quantidade em outra. A metodologia de RDA (*Representational Difference Analysis*) foi originalmente desenvolvida para a análise de diferenças entre DNAs genômicos de organismos estreitamente relacionados (LISITSYN *et al.*, 1993) e mais tarde, adaptada para a análise de diferenças na expressão em populações de mRNA. (HUBANK & SCHATZ, 1994). Atualmente, a metodologia de RDA tem sido utilizada principalmente para a identificação de fatores de virulência determinantes no entendimento da patogênese de microrganismos. Consiste em sucessivas etapas de hibridização subtrativa aplicadas a duas populações de mRNAs, seguidas de amplificação por PCR, proporcionando o enriquecimento das espécies de mRNA com expressão diferencial e ao mesmo tempo removendo aquelas espécies comuns às duas situações (mais detalhes no item 2.7.6 de Material e Métodos). Após o procedimento completo do RDA os produtos de expressão diferencial são resgatados (LUKYANOV *et al.*, 1997). Segundo PASTORIAN *et al.*, (2000) esta técnica é bastante flexível, pois, as populações de cDNA podem ser fracionadas por enzimas de restrição, com seqüências de reconhecimento curtas (quatro bases), para produzir sub-clones únicos de cDNA, aumentando a chance de clonagem das espécies com expressão diferencial. Além disso, estes autores demonstram que aquelas espécies de mRNA que são reprimidas na situação tratada também podem ser identificadas. Portanto esta

metodologia permite isolar e caracterizar um conjunto de genes com expressão aumentada ou diminuída durante um determinado processo.

1.4. Objetivos

O objetivo deste trabalho é o isolamento e a caracterização do gene *gpd*, que codifica para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, do fungo *Metarhizium anisopliae*. Este trabalho além de fornecer características do gene em si nos fornecerá uma região promotora com grande potencial para a construção de vetores de expressão no fungo *Metarhizium*, como já descrito em trabalhos com outros fungos filamentosos relacionados, possibilitando assim uma ferramenta valiosa para trabalhos futuros de regulação da expressão gênica no fungo e de teste da funcionalidade de genes isolados no processo de infecção de hospedeiros.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Organismos e Vetores

2.1.1 Linhagem de *Metarhizium anisopliae*

A linhagem do fungo *Metarhizium anisopliae* E₆, re-isolada de *Deois flavopicta*, oriunda do Estado do Espírito Santo foi utilizada nos experimentos.

2.1.2 Cepas bacterianas

Nos procedimentos de clonagem de fragmentos de DNA inseridos em vetores plasmidiais a cepa "hospedeira" XL1-Blue da bactéria *Escherichia coli*, que possui resistência ao antibiótico tetraciclina, foi utilizada.

Para o procedimento de infecção e amplificação de partículas virais a cepa LE392 de *E. coli* foi utilizada, também com resistência a tetraciclina.

Cepa	Genótipo relevante	Referência
XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F'[proAB⁺ lacI^q lacZ ΔM15 Tn10 (tet^r)</i>	SAMBROOK <i>et al.</i> , 2001
LE392	<i>supE44 supF58 hsdR514 galK2 galT22 metB1 trpR55 lacY1 Δ(lac-proAB)</i>	SAMBROOK <i>et al.</i> , 2001

2.1.3 Vetores

O vetor plasmidial pUC18, que confere resistência à ampicilina e possui marca de seleção baseada no operon *lacZ* de *E. coli* foi utilizado para as clonagens de DNA, o mapa do plasmídeo pode ser visto na Figura 2.1.

O vetor comercial de alta capacidade da biblioteca genômica de *Metarhizium*, LambdaGEM[®]-11 da Promega, foi utilizado; assim como o vetor λgt22A (Gibco BRL Life technologies) da biblioteca de cDNA.

2.2 Meios de cultura

A quantidade dos reagentes utilizados para a preparação dos meios de cultivo relacionados a seguir esta descrita em gramas por litro. Os meios foram esterilizados

por autoclavagem. Para os meios sólidos 2%, do volume final, de ágar foi adicionado a cada preparação.

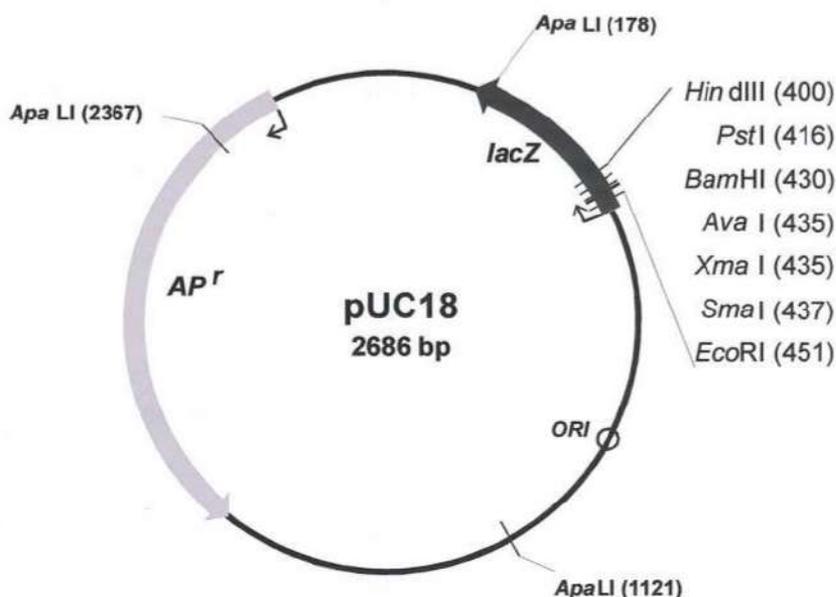


Figura 2.1. Mapa físico do vetor plasmidial pUC18. Os sítios de reconhecimento de algumas enzimas de restrição estão apontados. Os números entre parênteses representam a posição em pb. As seqüências codificantes estão representadas por setas, cinza claro e escuro. (ORI) representa a origem de replicação. (AP^r) resistência à ampicilina. (*lacZ*) operon lac.

2.2.1 Meio de Cove Completo (MCc)

NaNO ₃	6g
Glicose	10g
Peptona	2g
Casaminoácidos	1,5g
Extrato de Levedura	0,5g

O pH do meio pronto é ajustado para 6,5; e, após a autoclavagem, antes da inoculação, solução de sais e elementos traços devem ser adicionados a uma concentração de 2% e 0,04%, respectivamente, para desenvolvimento ótimo do fungo no meio de cultivo. A descrição da solução de sais e dos elementos traços segue abaixo:

Solução de sais:

KCl	26g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	26g
KH ₂ PO ₄	76g

Elementos Traços:

Na ₂ B ₄ O ₇ .10 H ₂ O	0,04g
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,4g
FeSO ₄	0,01g
MgSO ₄ .2 H ₂ O	0,8g
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,8g

2.2.2 Meio Luria-Bertani (LB)

Peptona bacteriológica	10g
Extrato de Levedura	5g
NaCl	10g

O pH foi ajustado para 7,5. Para o preparo do meio **LB Top ágar** uma concentração menor de ágar foi acrescentada, 0,7%, e no momento do uso apenas, após o aquecimento e liquefação do meio, 0,2% de maltose e 10mM de MgSO₄ foram acrescentados para o desenvolvimento ótimo do fago.

2.2.3 Meio SOC

Triptona	20g
Extrato de Levedura	5g
NaCl	0,5g

Adicionar 10mL de cloreto de potássio 250mM; ajustar o pH do meio para 7,0 com hidróxido de sódio 5N (~0,2mL). Ajustar o volume para 1L e esterilizar por autoclave. Adicionar apenas antes do uso, 5mL de solução de cloreto de magnésio 2M e 20mL de solução de glicose 1M esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

2.3 Antibióticos

Ampicilina e tetraciclina, concentrações de estoque e solvente utilizado. Ambos esterilizados por filtração com membrana de 0,22 μm .

2.4 Enzimas

A utilização (concentração de estoque e concentração de uso) de todas as enzimas foi feita segundo SAMBROOK *et al.*, 2001 e segundo determinações do fornecedor. Endonucleases de restrição, RNase/DNase, DNA-polimerases termoestáveis de alta fidelidade (Platinum® *Taq* DNA-polimerase Hi-Fi e DNA-polimerase *pfx*) e enzimas de modificação foram todas obtidas de fontes comerciais (Amersham Pharmacia Biotech, Invitrogen life technologies, USB) sendo que algumas endonucleases de restrição, como *EcoRI* e *PstI* por exemplo, e *Taq* DNA polimerase (baixa fidelidade) foram fornecidas pelo CenBiot (Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul).

2.5 Soluções e tampões

Soluções e tampões, excetuando-se os fornecidos por “kits” comerciais foram preparadas segundo SAMBROOK *et al.*, 2001.

2.5.1 Solventes

Fenol e clorofórmio: para procedimento de extração de DNA genômico fenol ácido foi utilizado, sendo para isso, apenas hidratado. Para extração de RNA do fungo o fenol hidratado foi tamponado com tris-HCl pH 8. Nas soluções de fenol e clorofórmio partes iguais de ambos foram misturadas.

2.5.2 Tampão de amostra para ácidos nucleicos

0,25% de azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol FF e 15% de ficoll em água.

2.5.3 TAE

Tris-acetato 40mM e EDTA 1mM pH 8,0.

2.5.4 TEB (tris-borato) 10X

Para preparação de 1L foram adicionados 108g de tris base, 55g ácido bórico, 40mL de EDTA 0,5M (pH8,0) e água em quantidade suficiente para 1L.

2.5.5 SSC 20X

Concentração final de 3M de cloreto de sódio e 0,3M de citrato de sódio. Para preparação de 1L 175,3g de cloreto de sódio e 88,2g de citrato de sódio foram utilizados em 1L. O pH foi ajustado para 7,0 com ácido clorídrico concentrado.

2.5.6 Soluções e tampões utilizados em PCR

Cloreto de magnésio: solução fornecida juntamente com a sua respectiva enzima DNA-polimerase. Concentração de estoque de 50mM e de uso de 1,5mM. Da mesma forma o tampão 10X específico para enzima foi fornecido.

dNTP: solução dos desoxirribonucleotídeos em uma concentração estoque de 2,5mM e concentração de uso variando de 200 μ M à 1mM em decorrência do tamanho de amplificação.

Oligonucleotídeos: Oligonucleotídeos inversos foram desenhados a partir do fragmento do gene *gpd* e sintetizados pela Invitrogen life technologies, com os seguintes conteúdos 5'CTCTGCTCCCTCTGCCGAT3' e 5'GGCTGTCTCGCAAGGTCATC3' para MAGPDH1 e MAGPDH2, respectivamente. Os Oligonucleotídeos foram utilizados em concentrações de estoque de 1mM e 20 μ M e em concentração de uso de 1 μ M.

2.6 Géis de agarose

Análises de DNA por migração eletroforetica foram feitas em gel de agarose com brometo de etídeo e visualizadas por radiação ultravioleta, sendo a agarose fundida em TAE 1X e submetida à eletroforese no tampão TAE 1X na voltagem de 100 volts por um tempo específico para procedimento. Na grande maioria dos experimentos a concentração utilizada nos géis foi de 1%. Nos experimentos de "Northern blot" os géis de agarose foram utilizados com formaldeído.

2.7 Procedimentos Experimentais

A grande maioria dos procedimentos experimentais foram feitos segundo SAMBROOK *et al.*, 2001 e especificações de "kits" comerciais.

2.7.1 Cultivo e manutenção dos microrganismos

2.7.1.1 *Metarhizium anisopliae*

Para preparação da suspensão de esporos de *M. anisopliae*, a linhagem E₆S₁ (2.1.1) foi cultivada em Meio de Cove Completo sólido (2.2.1), repicada a partir de colônias estoque do fungo, por aproximadamente sete dias à 28°C. Os esporos foram ressuspensos em solução estéril de tween 80 0,1%, com auxílio de alça de Drigalski, centrifugados a 5000rpm por 7 minutos e lavados duas vezes com água destilada, sendo sempre centrifugados entre cada lavagem. Após centrifugação os esporos foram ressuspensos em água estéril para uma concentração de aproximadamente 10⁸ a 10⁹ esporos por mL (a contagem foi feita com auxílio de uma câmara de Neubauer), e testados quanto a sua contaminação em LB (2.2.2) e em MCc (2.2.1).

2.7.1.2 Cepas bacterianas

A cepa LE392, utilizada nas infecções com bacteriófagos, foi mantida em placa estoque e cultivada apenas no dia anterior à sua utilização em 50mL do meio LB (2.2.2) suplementado com 0,2% de maltose. Cada preparação de 50mL rendia em média 5mL à 7mL de suspensão de células com uma concentração de aproximadamente 3-6x10⁶⁻⁸ células por mL.

A cepa XL1-Blue, utilizada nos procedimentos de transformação bacteriana por eletroporação, foi mantida em placa estoque e cultivada em pré-inóculo de 12mL do meio LB líquido com tetraciclina (2.3) para o preparo de células eletrocompetentes. 5mL do pré-inóculo foi adicionado à 500mL de LB líquido e mantido em desenvolvimento por aproximadamente 3 horas, aferindo-se a densidade ótica em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 600 nanômetros, a cada 30 minutos até a obtenção de uma concentração de 3-6x10⁸ células por mL. Após o desenvolvimento, as células foram incubadas em gelo por 15 a 30 minutos e experimentaram dois ciclos de centrifugação, a 5000rpm por 15 minutos, e lavagem com água MiliQ. O "pellet" resultante foi ressuspendido em 10ml de glicerol 10%, centrifugado sob a mesma rotação e tempo, e finalmente ressuspendido em um volume de glicerol 10%, suficiente para manter a concentração das células em aproximadamente 3x10¹⁰ células/mL, cerca de 2mL de glicerol 10% apenas. Este volume foi distribuído em alíquotas de 50µL, subitamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado à -80°C.

2.7.2 Transformação bacteriana por eletroporação

A construção pUC18/seqüência de interesse a ser inserida para amplificação na bactéria hospedeira XL1-Blue, era misturada a uma alíquota de células eletrocompetentes, preferencialmente mantendo uma baixa concentração de DNA e sais. Plasmídeo vetor e células foram, então, transferidos para cubeta de eletroporação e submetidos a pulsos de corrente elétrica com parâmetros de 2,5mV e 125Ω. Rapidamente após os pulsos, as células são transferidas para meio SOC (2.2.3) de regeneração por 1 hora à 37°C, e são plaqueadas em meio LB sólido (2.2.2) com ampicilina, IPTG e X-gal para seleção das colônias recombinantes.

2.7.3 Manipulação de DNA e RNA

2.7.3.1 Extração de DNA plasmidial bacteriano em pequena escala

As purificações de DNA plasmidial bacteriano foram todas feitas segundo protocolo de SAMBROOK *et al.*, 2001 para pequena escala.

2.7.3.2 Extração de DNA de *Metarhizium anisopliae*

Aproximadamente $1-5 \times 10^6$ esporos/mL do fungo foram inoculados em até 300mL de meio de cultivo líquido MCc (2.2.1). O micélio foi coletado por filtragem a vácuo, secado e macerado em nitrogênio líquido até a condição de pó. Aproximadamente 1g de micélio foi adicionada a um cada tubo eppendorf previamente preenchido com 0,2mL de tampão de lise (0,2M tris-HCl pH7,5 / 0,5M de NaCl / 0,01M EDTA / 1% de SDS) e 0,2 mL de fenol:clorofórmio (1:1 v/v). A mistura foi fortemente agitada por 5 minutos e centrifugada à 14000rpm por 10 minutos para separação das fases. A fase aquosa foi removida para tubo novo e re-extraída com 0,3mL de fenol:clorofórmio (1:1). A mistura foi novamente centrifugada por 5 minutos à 14000rpm e a fase aquosa foi removida para um tubo novo. dois volumes de etanol absoluto foram adicionados à fase e o tubo foi mantido à -20°C por 30 minutos. Os ácidos nucleicos foram "pelletados" por 10 minutos de centrifugação à 14000rpm, lavados com etanol 70% e deixados secar a temperatura ambiente. O "pellet" de DNA pode então ser ressuspensionado em 0,1mL de água destilada estéril ou água miliQ.

2.7.3.3 Extração de RNA de *Metarhizium anisopliae*

Aproximadamente $1-5 \times 10^6$ esporos/mL do fungo foram inoculados em até 300mL do meio de cultivo de interesse. O micélio foi pulverizado em nitrogênio líquido e transferido rapidamente para eppendorf previamente preenchido com 0,75mL de tampão de lise (0,6M NaCl / 10mM EDTA / 100mM tris-HCl pH8,0 / 4% SDS) e 0,3mL de fenol pH 8,0. A mistura então é agitada levemente por 15-20 minutos e centrifugada por 10 minutos à 10000rpm. A fase aquosa é transferida para um tubo novo e a ela são adicionados 1/2 volume de fenol e 1/2 volume de clorofórmio, a mistura é centrifugada 10 minutos por 10000rpm. A fase aquosa é novamente transferida e a ela são adicionados 0,75 volume de cloreto de lítio, o tubo é armazenado à 4°C "overnight". Após, agita-se brevemente e centrifuga-se 10 minutos por 10000rpm. O "pellet" resultante é ressuspensionado em 0,3mL de água DEPC estéril, 0,03mL de acetato de sódio 3M pH5,2 e 0,75mL de etanol absoluto e então precipitado por 2 horas à -20°C ou durante 30 minutos à -70°C. A mistura é centrifugada por 10 minutos à 10000rpm e o "pellet" resultante é lavado com etanol 70%, deixado secar à temperatura ambiente e ressuspensionado em 30µL de água DEPC. (SOKOLOVSKY *et al.*, 1990)

2.7.4 Reações de digestão de DNA

Todas reações de digestão de ácidos nucleicos foram feitas utilizando-se 1 unidade de enzima para digerir 1µg de DNA em 1 hora à temperatura específica de cada enzima e com o respectivo tampão comercial de cada enzima. As clivagens duplas (utilizando-se duas enzimas diferentes), quando a incompatibilidade de tampões era inevitável, foram feitas utilizando-se inicialmente o tampão de maior força iônica e procedendo com sua diluição até a concentração de sal desejada.

2.7.5 Clonagem de fragmentos de DNA

Todas reações de ligação foram feitas utilizando-se a enzima de modificação T4 DNA ligase e seu respectivo tampão, na presença de ATP, segundo SAMBROOK *et al.*, 2001. O vetor de clonagem pUC18 quando preparado para receber um inserto era digerido com a endonuclease de restrição apropriada e desfosforilado com a enzima de modificação Shrimp fosfatase alcalina. A fim de verificar a eficiência das reações (de digestão e de desfosforilação) o vetor apenas digerido era eletroporado,

o vetor digerido e re-ligado era eletroporado, assim como o vetor digerido e desfosforilado e apenas o vetor íntegro eram eletroporados; a análise foi feita levando-se em consideração o número relativo de colônias azuis (em LB sólido com X-gal, IPTG e ampicilina) e a quantidade absoluta de DNA utilizado nas eletroporações, que preferencialmente era normalizado. Nas reações de ligação utilizando-se extremidades “*blunt*”, o fragmento de DNA a ser inserido no vetor era submetido a um tratamento inicial com a enzima de modificação Klenow, para preenchimento das extremidades, e posterior tratamento com a enzima T4 polinucleotídeo quinase, para fosforilação das extremidades. Procedimentos adicionais citados segundo SAMBROOK *et al.*, 2001.

2.7.6 RDA (Random Differential Amplification)

Os procedimentos utilizados na técnica de RDA foram baseados no protocolo previamente descrito por PASTORIAN & CRAIG, 2000 e modificados por DUTRA (dados não publicados). O princípio básico da técnica é gerar duas “populações” de cDNAs derivadas de RNA isolado de diferentes estados celulares ou condições de cultivo e, amplificar seletivamente apenas aqueles cDNAs presentes em uma “população” e ausentes em outra; no caso do RDA aplicado ao fungo *Metarhizium anisopliae* as condições de cultivo foram em um meio contendo glicose como fonte única de carbono (denominado “*driver*”, ver a seguir) e um meio contendo cutícula do carrapato *Boophilus microplus* (modelo de infecção utilizado) como fonte única de carbono (denominado “*tester*”). Uma vez que há interesse nas proteínas envolvidas no processo de infecção, as atenções se voltaram para os genes expressos diferencialmente durante a degradação da cutícula. Segue abaixo um panorama do protocolo para melhor entendimento da técnica.

Uma vez isolado o RNA total nas diferentes condições, o mRNA é submetido à transcrição reversa e síntese da segunda fita de DNA utilizando-se de uma transcriptase reversa (MMLV, AMV, etc). Hibridizações eficientes e subseqüentes ampliações por PCRs dos cDNAs não podem ser feitas utilizando-se o cDNA originalmente sintetizado em toda sua extensão, a “população” de cDNA deve primeiro ser digerida com uma endonuclease de restrição com sítio curto de reconhecimento, como *Sau3AI*, produzindo assim um conjunto de fragmentos de cDNA, os quais devem possuir sítios de restrição iguais em ambas extremidades do fragmento e devem possuir um tamanho ótimo de 200 à 1000pb, assegurando assim

uma amplificação eficiente por PCR. Os produtos resultantes da digestão são então purificados utilizando-se "kit" GFX (Amershan Pharmacia Biotech).

Para tornar os fragmentos de cDNA amplificáveis por PCR e assim gerar uma quantidade apropriada de material inicial, adaptadores devem ser ligados a cada uma de suas extremidades. Uma combinação de adaptadores, consistindo de um oligonucleotídeo de 24 bases próprio para PCR e um outro menor de 12 bases complementar ao oligonucleotídeo maior (24 bases) e ao sítio de restrição das extremidades dos fragmentos de cDNA, foram utilizados. O anelamento cria uma "ponte" temporária formada pelo oligonucleotídeo de 12 bases que posiciona o oligonucleotídeo de 24 bases em orientação adjacente ao fragmento de cDNA digerido, permitindo assim a ligação direta do oligonucleotídeo de 24 bases à extremidade 5' do cDNA. Depois da ligação pronta o conjunto é submetido à ação da enzima *Taq* polimerase para preenchimento da "lacuna" deixada pela diferença de tamanho dos oligonucleotídeos (12 e 24 bases) ligados ao cDNA. Este procedimento gera os oligonucleotídeo dupla-fita com seqüências conhecidas necessários para amplificação exponencial por PCR, que irá originar material em quantidade apropriada para a técnica. Esse procedimento foi feito para as duas "populações" de mRNA anteriormente descritas, gerando os cDNA "driver" (fungo cultivado em meio com glicose) e cDNA "tester" (fungo cultivado em meio com cutícula do carrapato). O "driver" é o fator de eliminação dos produtos expressos comuns a ambas "populações" de cDNA, e é sempre utilizado em uma proporção maior que a de "tester" nos processos de hibridização subtrativa.

Os produtos finais do PCR inicial, tanto o cDNA "driver" como o cDNA "tester", são digeridos com a mesma endonuclease de restrição, o exemplo dado anteriormente foi para *Sau3AI*, para liberação dos adaptadores iniciais. Os produtos são então purificados e apenas a "população tester" é ligada a um novo conjunto de adaptadores de 24 e 12 bases, que dessa forma estarão prontos para o primeiro "round" de hibridização subtrativa (ver a seguir), procedendo-se da mesma forma (troca por novos adaptadores sem homologia aos anteriores) para cada "round" sucessivo de hibridização. O uso de oligonucleotídeos únicos sem homologia aos originais (anteriores) para cada "round" da técnica de RDA assegura que a amplificação dos cDNAs será o resultado de novos oligonucleotídeos ligados e não de oligonucleotídeos originais não digeridos que possam ter sido carregados de um "round" anterior.

No processo de hibridização subtrativa uma mistura composta de cDNA "driver" e cDNA "tester", em uma razão inicial de "driver": "tester" de 10:1, compõe o primeiro "round" da hibridização, onde três possibilidades de hibridização serão possíveis: "driver-driver", híbrido "driver-tester" e os produtos diferencialmente expressos "tester-tester". É importante lembrar que a "população driver" compõem aqueles elementos expressos na condição de fonte basal de glicose (no experimento com *M. anisopliae*) e por isso constituem o fator de subtração dos produtos expressos em ambas "populações", que serão representados pelos produtos "driver-tester". A maioria dos fragmentos de cDNAs oriundos dos mRNAs comuns às duas populações de cDNAs rapidamente formam o híbrido "driver-tester" devido ao excesso de cDNA "driver" presente na reação. Os cDNAs diferencialmente expressos que estão presentes na "população tester" e ausentes (ou presentes em uma quantidade muito menor) na "população driver" requerem um período de tempo significativamente maior para hibridizarem-se completamente e formarem os produtos "tester-tester".

Após o passo de hibridização os adaptadores ligados unicamente à "população tester" constituem-se em um fator chave para o prosseguimento da técnica, pois é a partir deles que apenas os produtos diferencialmente expressos ("tester"- "tester") serão amplificados por PCR, com o auxílio de oligonucleotídeos complementares à eles, sendo exponencialmente selecionados dos restantes não diferenciais. O produto "tester"- "tester" é o único com condições de amplificação exponencial, uma vez que apenas a "população tester" recebe, inicialmente, adaptadores, logo, produtos "driver-driver" e "driver-tester" não são passíveis de amplificação exponencial. Com o término da PCR os produtos amplificados são purificados, clivados com *Sau3AI* e um novo conjunto de adaptadores (diferente do anterior) é ligado a eles, logo, um segundo "round" de hibridização subtrativa pode ser iniciado, entretanto, deve-se proceder com um aumento da razão "driver:tester" para 100:1. Esse mesmo procedimento pode ser feito várias vezes, aumentando-se sempre a proporção de "driver" em relação à de "tester". Finalmente, os produtos diferencialmente expressos podem ser purificados e clonados em um vetor de clonagem, procedendo-se então com a análise por seqüenciamento dos produtos.

2.7.7 Construção da biblioteca genômica

A construção da biblioteca genômica de *Metarhizium anisopliae* foi feita com o "kit Genomic Cloning" (Promega Corporation) previamente ao desenvolvimento deste projeto, mas será incluída aqui devido a sua importância em relação a este trabalho. O vetor LambdaGEM[®] derivado do EMBL3, utilizado para construção do banco, tem capacidade para insertos de até 14kb e possui várias vantagens sobre os vetores EMBL, como sítio múltiplo de clonagem; promotores dos bacteriófagos T7 e SP6 em orientação opostas no vetor e sítios de restrição assimétricos para *Sfi*I flanqueando a região promotora e de clonagem. Além disso, o "background" na produção de bacteriófagos parentais é baixo devido à eliminação da religação dos "braços" do lambda com sua seqüência central por uma digestão secundária com a endonuclease *Eco*RI e remoção do pequeno fragmento *Bam*HI-*Eco*RI, o que anula a homologia entre as extremidades da seqüência central e dos "braços".

Inicialmente o DNA genômico isolado é parcialmente digerido para redução do tamanho da seqüência com uma endonuclease de quatro bases de reconhecimento, como *Sau*3AI, e os fragmentos são então clonados no sítio de restrição da enzima compatível, *Bam*HI, no vetor. O vetor é previamente clivado com a endonuclease de restrição compatível que possibilitará a clonagem dos fragmentos de DNA genômico, criados pela restrição com *Sau*3AI, e desfosforilado antes da reação de ligação.

Após a ligação, o vetor com o inserto pode ser então empacotado utilizando-se do extrato de partículas virais Packagene[®] Extract e amplificado segundo SAMBROOK *et al.*, 2001.

2.7.8 Construção da biblioteca de DNA complementar (cDNA)

A construção da biblioteca de cDNA foi feita segundo o "kit" SuperScript Lambda System for cDNA Synthesis and λ Cloning da Gibco BRL life technologies, anteriormente à realização deste trabalho, mas será adicionado devido a sua importância. Uma biblioteca de cDNA para ser considerada de boa qualidade deve ser suficientemente grande para conter, representativamente, todas seqüências de interesse, algumas das quais podendo ser derivadas de mRNAs de baixa abundância. Deve incluir um número mínimo de clones que contenham pequenos insertos de cDNA (freqüentemente definidos como menor ou iguais à 500pb). E deve

também ser composta de insertos de cDNA que sejam cópias inteiras dos mRNAs dos quais eles foram derivados.

O passo inicial de extração do mRNA é crítico para preparação do banco, pois a qualidade do mesmo dependerá deste procedimento. Uma determinada condição deve ser escolhida para cultivo do microorganismo e extração do RNA. Para bons resultados o mRNA é purificado em colunas de oligo(dT) celulose, selecionando assim o RNA poliadenilado [poli(A)⁺]. Depois de isolado o mRNA procede-se com a síntese da primeira fita por reação de transcriptase reversa (RT) utilizando-se uma enzima própria (AMV, MMLV). A iniciação da primeira fita depende da hibridização do oligonucleotídeo ao mRNA, normalmente na cauda de poli(A).

A seqüência primária do mRNA é recriada como segunda fita de DNA usando a primeira fita de cDNA como molde. A síntese da primeira e da segunda fita são feitas no mesmo tubo, sem extrações intermediárias com solventes orgânicos ou precipitação com etanol. Os produtos serão cDNA com extremidades cegas. Para maximizar a eficiência de ligação ao vetor, adaptadores são adicionados ao cDNA que é também clivado com a endonuclease *NotI*. Após esse procedimento, o cDNA é fracionado por tamanho em coluna de cromatografia e estará pronto para ligação ao vetor.

2.7.9 Preparo da sonda para procedimentos de hibridização

O plasmídeo pUC18 contendo o fragmento do gene *gpd* de *M. anisopliae* foi digerido com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *BamHI* e submetido à eletroforese em gel de agarose 1%. O fragmento de aproximadamente 570pb foi excisado do gel e purificado pelo "kit" GFX (Amershan Pharmacia Biotech). O fragmento purificado foi utilizado então como sonda nos procedimentos de hibridização, segundo protocolos dos "kits" de marcação enzimática de DNA. Obs.: Todas purificações de DNA foram feitas com "kits" GFX e serão remetidas para o tópico 2.7.9 no decorrer do trabalho.

2.7.10 "Screening" de biblioteca genômica

O procedimento de "screening" da biblioteca genômica foi feito segundo SAMBROOK *et al.*, 2001 e a detecção segundo "kit" ECL direct nucleic acid labelling and detection systems (Amershan Pharmacia Biotech). A cepa bacteriana LE392 foi utilizada para infecção viral em uma proporção bactéria:fago de 1:1. Inicialmente se

procedeu com a titulação do banco para aferição da melhor diluição a ser utilizada. Três diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram testadas, onde a diluição de 10^{-2} se mostrou com um número ótimo de placas de lise para o "screening" (confluência das placas de lise). A representatividade dos genes foi estabelecida para 7 placas de Petry. Após isolamento de algumas placas de lise, o "re-screening" foi feito da mesma forma, porém com uma diluição maior do número de partículas virais, evitando a confluência de placas de lise.

2.7.11 Precipitação de partículas virais com PEG e extração de DNA viral

Todos procedimentos referentes à manipulação de bacteriófagos foram feitos segundo SAMBROOK *et al.*, 2001. Basicamente, após infecção e lise pelos bacteriófagos, se procede com a degradação inicial dos ácidos nucléicos bacterianos adicionando-se DNase I e RNase ao lisado. Após incubação de 30 minutos adiciona-se cloreto de sódio com a finalidade de dissociar as partículas virais do "debr" bacteriano, que é removido por centrifugação. Ao sobrenadante, PEG 8000 é adicionado para precipitação dos bacteriófagos. Após centrifugação, o "pellet" resultante é ressuspenso em um volume pequeno que experimenta limpeza com clorofórmio para remoção do PEG e as partículas podem ser rompidas por incubação à 65°C em solução de SDS 10% e EDTA 0,5M pH8,0. E, finalmente, o DNA viral é isolado por extração com fenol e clorofórmio e precipitado com etanol absoluto.

2.7.12 "Southern blot" e "Northern blot"

As técnicas de "southern blot" e "northern blot" foram feitas segundo SAMBROOK *et al.*, 2001. Nos experimentos de "southern blot" a transferência dos ácidos desoxirribonucléicos foi efetuada por capilaridade ou por utilização de aparato com bomba de vácuo, para membrana de nailon Hybond (Amersham Pharmacia Biotech); em todos experimentos o controle positivo consistiu do fragmento do gene *gpd*, utilizado como sonda, em uma diluição de 1:200. O DNA utilizado nas hibridizações foi previamente digerido com as enzimas de restrição apropriadas (2.7.4), seja DNA genômico de *M. anisopliae* ou clone oriundo da biblioteca genômica e submetido à eletroforese em gel de agarose 1%. As lavagens de estringências utilizaram SSC 0,5.

Nos experimentos de "Northern blot" o RNA foi corado com brometo de etídio e foi resolvido em gel de agarose/formaldeído 1,2% e transferido para membrana de náilon por capilaridade. O controle positivo utilizado nos experimentos foi o gene *tef-1 α* .

O "kit ECL direct nucleic acid labelling and detection systems" (Amersham Pharmacia Biotech) foi utilizado para a detecção nos procedimentos de "southern", seguindo-se orientações do fornecedor; enquanto que o "kit Gene Images random prime labelling module e gene images CDP-star detection module" (Amersham Pharmacia Biotech) foi utilizado nos experimentos de "northern".

2.7.13 Reações de polimerização em cadeia (PCR) de DNA

Todos PCRs foram feitos segundo SAMBROOK *et al.*, 2001. As concentrações padrão de reagentes para a grande maioria de reações são de 1,5mM de cloreto de magnésio, de 200 μ M à 1mM de DNTPs (variando com o tamanho da amplificação), 1 μ M de oligonucleotídeos e 1-5 unidades de DNA-polimerase. Os programas utilizados nos termocicladores basicamente seguem o padrão de 1 à 2 minutos de desnaturação inicial (94°C), 30 segundos na temperatura de anelamento específica dos oligonucleotídeos, um tempo variável (dependendo do tamanho do produto a ser amplificado: ~1minutos para cada 1,0kb incorporados) na temperatura de atividade da enzima polimerase (que varia com o tipo da enzima) e um número de 30 ciclos, podendo estar sujeito à variações.

2.7.14 Reação inversa de polimerização em cadeia (PCRi) de DNA

A técnica de PCRi é utilizada para amplificar e clonar seqüências de DNA desconhecidas que flanqueiam a extremidade de uma seqüência conhecida de DNA. Ela envolve a digestão por uma endonuclease de restrição de uma preparação de DNA contendo as seqüências conhecidas e suas regiões flanqueadoras. Os fragmentos individuais são convertidos em moléculas circulares por ligação intramolecular e o DNA circularizado é então utilizado como molde em uma PCR. A seqüência flanqueadora desconhecida é amplificada por dois oligonucleotídeos que ligam-se especificamente à seqüência conhecida e são orientados em direções opostas (orientação inversa ao de uma PCR convencional).

Inicialmente é feita a digestão do DNA genômico com uma endonuclease de restrição que não cliva a seqüência conhecida do gene, aproximadamente 1,5 μ g do

DNA genômico de *M. anisopliae* foi digerido com a enzima *XhoI*. “*Southern blot*” pode ser utilizado na identificação de uma endonuclease que origine um fragmento de tamanho apropriado para amplificação por PCR. A escolha de uma enzima que produza um terminal complementar coesivo aumenta a eficiência de circularização do DNA molde durante a reação de ligação.

Após a digestão do DNA genômico procede-se com a reação de ligação para circularização, que deve ser feita sob condições que favoreçam a auto-ligação dos fragmentos (ligação intra-molecular) resultando na formação de fragmentos monoméricos circulares. A concentração molar de extremidades de DNA deve obrigatoriamente ser baixa para favorecer a formação de DNA circular intra-molecular em concatâmeros, a concentração de DNA molde deve encontrar-se em um intervalo de 0,1 à 1ng/ μ L na reação. Normalmente duas reações de ligação, com uma concentração mínima de 0,15ng/ μ L e máxima de 0,9 ng/ μ L, eram feitas em paralelo.

A linearização da molécula formada pode ser feita através da digestão do fragmento ou pode ser feita pelo aquecimento, acredita-se que o aumento do passo inicial de desnaturação do DNA, durante a PCR, seja o suficiente para a linearização; um passo adicional final de extensão por 10 minutos é incorporado no programa. A identidade do fragmento amplificado pode ser confirmada por seqüenciamento, por mapeamento por restrição ou por “*southern blot*” utilizando uma sonda homóloga à seqüência conhecida de DNA. Os Oligonucleotídeos inversos utilizados, com os seguintes conteúdos CTCTGCTCCCTCTGCCGAT e GGCTGTCGGCAAGGTCATC para MAGPDH1 e MAGPDH2 respectivamente, foram desenhados a partir da seqüência de ~570pb do gene *gpd* de *M. anisopliae* e sintetizados pela Invitrogen life technologies.

2.7.15 Sequenciamento e análise de DNA

Os sequenciamentos automáticos foram procedidos segundo “*Dyemonic ET Dye Terminator cycle sequencing Kit*” com o sistema de análise de DNA MegaBace (Amershan Pharmacia Biotech). A qualidade das bases obtidas foi avaliada pelo programa Phred antes das mesmas serem submetidas ao banco de dados do GenBank usando o programa BLAST (Altschul, 1997).

Para os alinhamentos múltiplos das seqüências deduzidas de resíduos de aminoácidos e edição das mesmas os programas Clustaw e Genedoc foram

utilizados. Para criação de mapas físicos de seqüências e desenho de oligonucleotídeos o programa Vector NTI 8.0 foi usado.

3. RESULTADOS

3.1. Clonagem do gene *gpd* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) de *Metarhizium anisopliae*.

Visando o isolamento de genes de *M. anisopliae* com expressão diferencial durante o processo de infecção de cutícula do carrapato *Boophilus microplus*, foi procedida em nosso laboratório uma análise utilizando a metodologia de RDA (*Random Differential Amplification*) (DUTRA *et al.*, comunicação pessoal). RNA de *M. anisopliae* foi extraído de cultura em meio com glicose e de cultura em meio contendo cutícula do carrapato *Boophilus microplus*, os quais foram utilizados para a síntese de cDNA. As populações de cDNA foram comparadas por RDA (2.7.6) e as seqüências diferencialmente expressadas foram clonadas no vetor pUC18 e analisadas por sequenciamento.

As seqüências obtidas foram aferidas quanto à qualidade e comparadas com as seqüências depositadas no banco de seqüências do NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL, 1997). Entre outras, uma seqüência de aproximadamente 570pb de um dos clones apresentou alta homologia com o gene ortólogo *gpd* (codifica GAPDH) de outros fungos filamentosos, tais como o gene *gpd* de *Trichoderma harzianum* com 100% de homologia e de *T. koningii* com 96% de homologia, o gene *GPD1* de *Claviceps purpurea* com 100% de homologia, o gene *gpd* de *Podospora anserina* (96% de homologia), os genes *ccg-7* (85%) e *gpd-1* (96%) de *Neurospora crassa* e o gene *gpd* de *Sordaria macrospora* (84%), entre outros. A comparação das seqüências deduzidas de aminoácidos está mostrada na Figura 3.1. O mapa físico da seqüência ortóloga do gene *gpd* de *M. anisopliae* esta representado na Figura 3.2.

	*	20	*	40	*	60	
<i>A. nidulans</i>	KKVVISAPSADAPMFVMGVNNEITYKKDIOVLSNASCTTNCLAPLAKVINDNFCIIEGLMT						60
<i>N. crassa</i>	KKVIIISAPSADAPMYVMGVNNEITYDGSADVISNASCTTNCLAPLAKVIHDNFTIIVEGLMT						60
<i>T. koningii</i>	KKVIIISAPSADAPMYVMGVNESDYDGSADVISNASCTTNCLAPLAKVINDNYCIVEGLMT						60
<i>M. anisopli</i>	RRLVISAPSADAPMYVMGVNEKTYDGKADVISNASCTTNCLAPLAKAIHDKETMSR-VSP						59
	4466ISAPSADAPM5VMGVN tYdg adv6SNASCTTNCLAPLAKvI Dn5 6 eg6mt						
	*	80	*	100	*	120	
<i>A. nidulans</i>	TVHSYTATQKVVVDGPSAKDWRGGRTAATNIIPSSSTGAAKAVGKVIPSLNGKLTGMAMRVP						120
<i>N. crassa</i>	TVHSYTATQKTVDGPSAKDWRGGRTAAONIIPSSSTGAAKAVGKVIPDLNGKLTGMAMRVP						120
<i>T. koningii</i>	TVHSYTATQKTVDGPSAKDWRGGRGAAONIIPSSSTGAAKAVGKVIPALNGKLTGMSIRVP						120
<i>M. anisopli</i>	PSTPTPPPRPSTAPHGKDWRGGRGAAONIIPSSSTGAAKAVGKVIPDLNGKLTGMSMRVP						119
consenso	tvhsytatq4 vdgPsaKDWRGGR AAqNIIPSSSTGAAKAVGKVIP LNGKLTGM 6RVP						
	*	140					
<i>A. nidulans</i>	TSNVSVDLTVRIEKAVTYDQIKDAVKK						148
<i>N. crassa</i>	TANVSVDLTVRIEKGATYDEIKEVIKK						148
<i>T. koningii</i>	TANVSVDLTVRIEKGASYEETETIKK						148
<i>M. anisopli</i>	TANVSVDLTVRIEKGASYDEIRSWIVE						147
consenso	TaNVSVVDLT RiEKga3Yd2I 6kk						

Figura 3.1. Comparação da sequência deduzida de aminoácidos do fragmento de *gpd* de *M. anisopliae* com seus ortólogos. *Aspergillus nidulans* (M19694), *Neurospora crassa* (U56397), *Trichoderma koningii* (D14518). Os aminoácidos marcados em preto apresentam 100% de identidade com a sequência de *M. anisopliae*. As seqüências marcadas em cinza representam identidade com pelo menos um dos fungos comparados. Os números na seqüência consenso representam o grupo no qual os aminoácidos estão arrolados. A comparação foi realizada com auxílio do programa Clustaw.

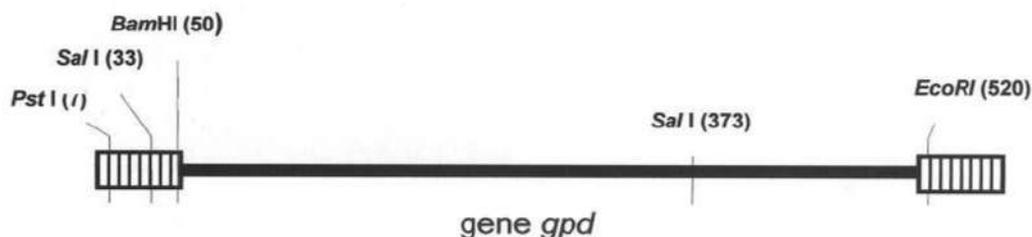


Figura 3.2. Mapa físico do fragmento de DNA correspondente ao gene *gpd* de *M. anisopliae*. As caixas listradas representam o vetor pUC18. A linha preta representa a seqüência de *M. anisopliae*. Os sítios de reconhecimento de algumas endonucleases de restrição estão apontados. Os números entre parêntesis representam a posição em pb.

3.2. "Southern blot" do DNA genômico de *Metarhizium anisopliae*

Para a confirmação de que a seqüência do gene *gpd* clonada está no genoma de *M. anisopliae* e para verificar a sua organização foi procedida a hibridização do fragmento de DNA correspondente ao gene *gpd* com o DNA genômico do fungo. O fragmento de DNA foi isolado a partir do clone no vetor pUC18 por digestão com as endonucleases *EcoRI* e *BamHI* (2.7.4) e o fragmento foi purificado de gel de agarose após eletroforese (2.7.9).

Para o "Southern blot" (2.7.12) genômico de *Metarhizium* aproximadamente 2 μ g de DNA foram extraídos (2.7.3.2) e digerido com cada uma das seguintes endonucleases de restrição *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *Sall* e *XhoI* (2.7.4). O DNA digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (2.6, Figura 3.3.A). O DNA foi transferido para membrana de náilon (2.7.12) e hibridizado com aproximadamente 60ng do fragmento de DNA de *gpd* de *M. anisopliae* marcado enzimaticamente (2.7.12). O padrão de hibridização pode ser observado na Figura 3.3.B, onde se constata a presença do gene *gpd* no DNA genômico do fungo e os diferentes padrões de restrição relacionados ao gene podem ser visualizados.

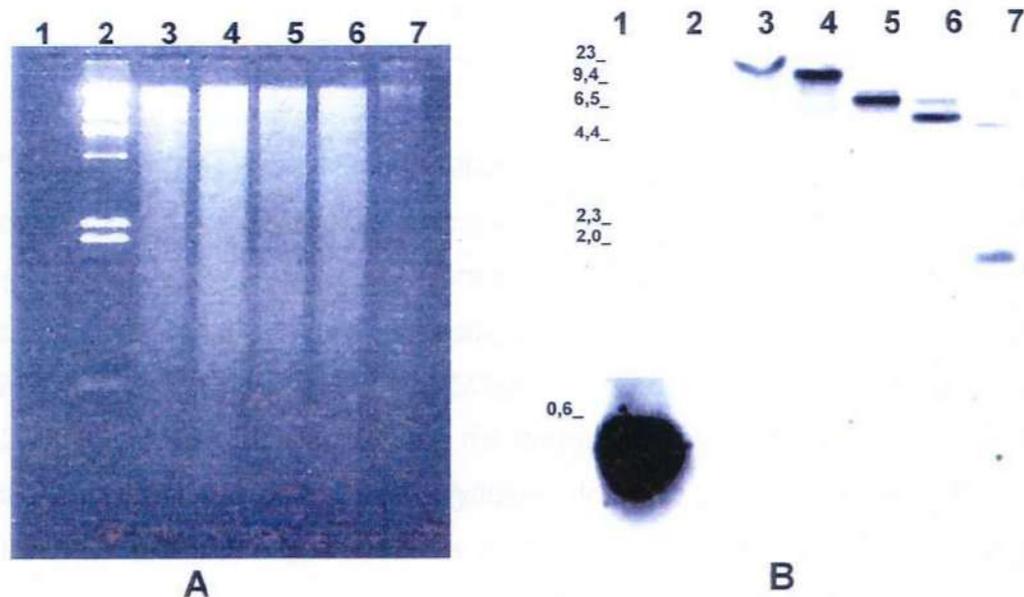


Figura 3.3. "Southern blot" genômico de *Metarhizium anisopliae*. Painel (A): eletroforese em gel de agarose do DNA genômico digerido com diferentes endonucleases de restrição. (B) Autorradiografia da hibridização utilizando o fragmento de DNA do gene *gpd* de *M. anisopliae* como sonda. Canaletas: (1) DNA do fragmento de 600pb correspondente ao gene *gpd* de *M. anisopliae*; (2)-marcador de tamanho molecular λ -*HindIII*; (3)-clivagem com *BamHI*; (4)-clivagem com *EcoRI*; (5)-clivagem com *HindIII*; (6)-clivagem com *Sall*; (7)-clivagem com *XhoI*. Os números à esquerda da autorradiografia representam o tamanho em kb.

3.3. "Screening" da biblioteca genômica de *Metarhizium anisopliae*

Com o objetivo de isolar o gene *gpd* completo o fragmento de DNA de aproximadamente 600pb correspondente ao gene *gpd* foi utilizado como sonda para o "screening" de uma biblioteca genômica com construção baseada no vetor derivado de bacteriófago λ (Lambda GEM-11, Promega). Inicialmente o título do banco foi determinado para a obtenção de placas de lise confluentes a fim de se utilizar uma diluição com o máximo de clones de fago por placa de Petry (2.7.10). A diluição de 10^{-2} foi utilizada ($\cong 3.000$ placas de lise/placa de Petry). Sete placas de Petry foram utilizadas para o procedimento de transferência das placas de lise para membrana de náilon e hibridização (2.7.10), obtendo assim uma representatividade satisfatória do genoma de *M. anisopliae*. Como resultado cinco placas de lise com sinal de hibridização positivo foram selecionadas para um segundo "screening", onde cada uma das placas de lise foi isolada e re-hibridizada separadamente. Destes cinco possíveis clones positivos, apenas três se mostraram positivos nesta nova hibridização com a sonda do gene *gpd*, onde vários sinais fortes de hibridização em uma mesma placa de Petry puderam ser detectados. As placas de lise foram coletadas respeitando-se a distinção entre os diferentes clones, os quais foram nomeados como: $\lambda gpd-A$, $\lambda gpd-B$ e $\lambda gpd-E$.

3.4 "Southern blot" dos clones $\lambda gpd-A$, $\lambda gpd-B$ e $\lambda gpd-E$

Os clones $\lambda gpd-B$ e $\lambda gpd-E$ isolados e purificados a partir do "screening" da biblioteca genômica de *M. anisopliae* foram amplificados separadamente para a obtenção de uma grande quantidade de partículas virais (2.7.10). DNA dos fagos foi extraído (2.7.11) e aproximadamente 150ng deste foi utilizado para reação de clivagem (2.7.4) com as endonucleases de restrição *Sall* e *XhoI*, levando-se em consideração os sítios de restrição do "polylinker" do vetor Lambda GEM-11 utilizado na construção da biblioteca genômica e priorizando a liberação do inserto dos "braços" do vetor (2.7.7). Este material foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e transferido para membrana de náilon para hibridização utilizando aproximadamente 50ng do fragmento do gene *gpd* de *M. anisopliae* como sonda (2.7.12). O resultado da hibridização está apresentado na Figura 3.4B. Apenas o clone $\lambda gpd-B$ apresentou sinal de hibridização positivo e na Figura 3.4 podemos visualizar bandas de hibridização em torno de 6,5kb e 12,0kb para as clivagens com

Sall e *XhoI*, respectivamente. Este resultado confirma o conteúdo do clone λ *gpd-B* como todo ou parte da seqüência do gene *gpd* de *M. anisopliae*.

3.5 Subclonagem do fragmento de DNA que corresponde ao gene *gpd* do clone λ *gpd-B*

Com o intuito de caracterizar o clone λ *gpd-B*, oriundo da biblioteca genômica de *M. anisopliae* e com isso descobrir padrões de clivagem que gerassem fragmentos de DNA compatíveis com a clonagem no vetor plasmidial pUC18, outros "Southern blots", utilizando o fragmento do gene *gpd* como sonda, foram realizados submetendo o DNA a diferentes endonucleases de restrição, tanto em reações de clivagem simples como em reações de clivagem dupla (2.7.4). Entretanto, não houve sucesso na obtenção de padrões de restrição com fragmentos de DNA de tamanho menor com hibridização positiva.

Foram feitas tentativas, sem sucesso, de subclonagem dos fragmentos de DNA de 6,5kb e 12,0kb para as clivagens com *Sall* e *XhoI* em pUC18 (2.7.5) admitindo-se a dificuldade de se trabalhar com fragmentos com estes tamanhos moleculares. Com base nisto, optamos inicialmente pela alternativa de PCR inverso (próximo item).

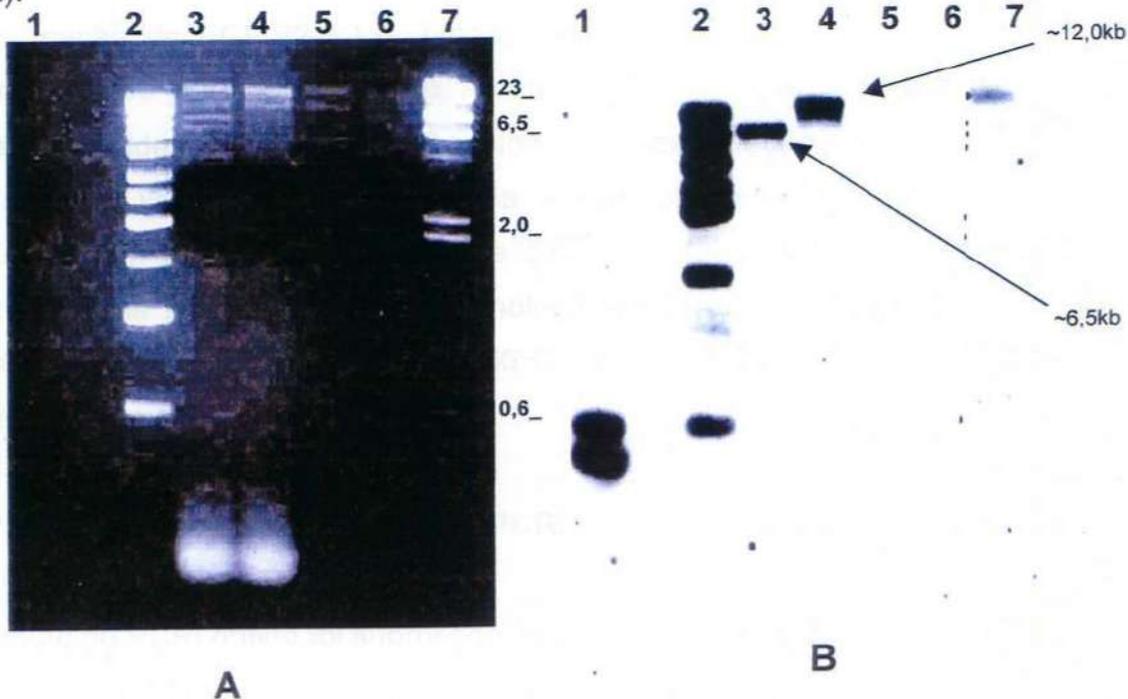


Figura 3.4. "Southern blot" dos clones oriundos da biblioteca genômica de *M. anisopliae*. Painel (A): eletroforese em gel de agarose do DNA dos clones λ *gpd-B* e λ *gpd-E* clivados com *Sall* e *XhoI*. (B) Autorradiografia da hibridização utilizando o fragmento de DNA do gene *gpd* de *M. anisopliae* como sonda. Canaletas: (1) controle positivo; (2) marcador de tamanho

molecular ladder; (3) λ *gpd*-B digerido com *Sall*; (4) λ *gpd*-B digerido com *Xho*I; (5) λ *gpd*-E digerido com *Sall*; (6) λ *gpd*-E digerido com *Xho*I; (7) marcador de tamanho molecular λ -*Hind*III. O tamanho respectivo de cada banda com sinal de hibridização está indicado por uma seta no painel B. Os números à esquerda da autorradiografia representam o tamanho em kb.

3.6 Reação de Polimerização em Cadeia inversa com oligonucleotídeos específicos para o gene *gpd*

Devido à dificuldade em se subclonar os fragmentos de DNA do clone genômico e ao grande interesse na região promotora do gene *gpd*, para a construção de vetores de expressão homólogos de *M. anisopliae*, aliado ao fato de se trabalhar com uma seqüência homóloga conhecida do gene, a técnica de Reação de Polimerização em Cadeia inversa (PCRi) (2.7.14) foi empregada. Na técnica foram utilizados 1,5 μ g de DNA genômico de *M. anisopliae* para a reação de clivagem com a endonuclease *Xho*I (2.7.4), levando-se em consideração o padrão de clivagem evidenciado no "Southern Blot" genômico (Figura 3.3) e a maior facilidade de se trabalhar com um fragmento de aproximadamente 2,0kb. Concentrações baixas de DNA foram utilizadas nas reações de ligação, favorecendo assim a formação de fragmentos monoméricos circulares (2.7.14). Este material foi utilizado em reação de PCR (2.7.13), utilizando oligonucleotídeos sintetizados a partir da seqüência do gene *gpd* do fungo. A otimização da reação em gradiente de temperatura foi obtida à 52°C com 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão e pode ser visualizado na Figura 3.5a. A obtenção de um produto de PCR de banda única com temperaturas acima de 52°C não foi alcançada, ocorrendo amplificação de duas bandas de tamanho molecular de 1,5kb e 2,0kb com uma temperatura de anelamento de no máximo 56°C. Temperaturas superiores a esta resultaram em não amplificação.

3.7 "Southern blot" do produto de PCRi com oligonucleotídeos para o gene *gpd*

O produto de PCRi obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, transferido para membrana de nylon e exposto à hibridização com o fragmento de *gpd* de *M. anisopliae* marcado enzimaticamente (2.7.9). O resultado é mostrado na figura 3.5b, onde um sinal forte de hibridização é visto na banda de tamanho

molecular de aproximadamente 2,0kb, isto comprova a especificidade da amplificação obtida por PCR a partir dos oligonucleotídeos desenhados.

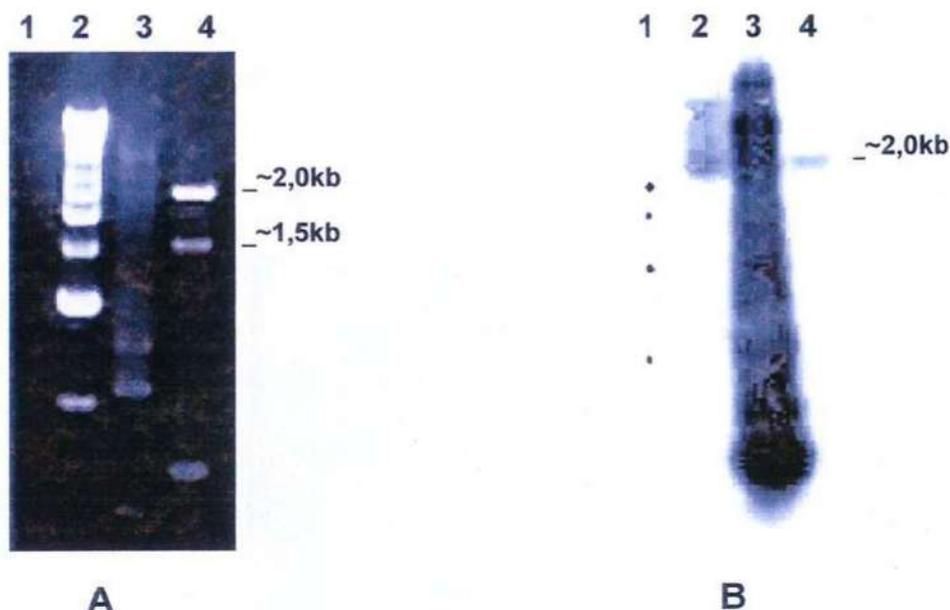


Figura 3.5. "Southern blot" do produto de PCR inverso. Painel (A): eletroforese em gel de agarose do produto de PCRi. (B) Autorradiografia da hibridização utilizando o fragmento de DNA do gene *gpd* de *M. anisopliae* como sonda. Canaletas: (1) controle negativo da reação; (2) marcador de tamanho molecular ladder; (3) controle positivo (clone em pUC18 do fragmento homólogo de *gpd* de aproximadamente 500pb); (4) reação com DNA genômico de *M. anisopliae*. O tamanho molecular de cada amplificação, assim como o resultado da hibridização são apontados ao lado das figuras.

3.8 Clonagem do produto de PCRi

Após a confirmação da amplificação de um amplicon de aproximadamente 2,0kb como sendo específico para o gene *gpd* de *M. anisopliae*, por "Southern blot" do produto de PCRi, o fragmento de DNA foi excisado do gel, purificado (2.7.9) e clonado em vetor pUC18 após tratamento com a enzima Klenow e T4 polinucleotídeo quinase (2.7.5). Doze clones com insertos de 2,0kb foram obtidos e aguardam análise por seqüenciamento.

3.9 PCR do banco de cDNA de *Metarhizium anisopliae*

Possuindo oligonucleotídeos específicos para a seqüência do gene *gpd* de *M. anisopliae*, a alternativa de amplificação do gene *gpd* de *M. anisopliae* por PCR (2.7.13) do banco de cDNA (2.7.8) do fungo, utilizando o oligonucleotídeo T7, de um

dos "braços" do vetor do banco, associado ao oligonucleotídeo específico, MAGPDH1, foi procedida. Um amplicon único de aproximadamente 1,0kb foi amplificado (Figura 3.6), excisado do gel, purificado (2.7.9) e clonado em vetor pUC18, após tratamento com a enzima Klenow e T4 polinucleotídeo quinase (2.7.5). Dez clones possuindo insertos de 1,0kb foram isolados e aguardam seqüenciamento.

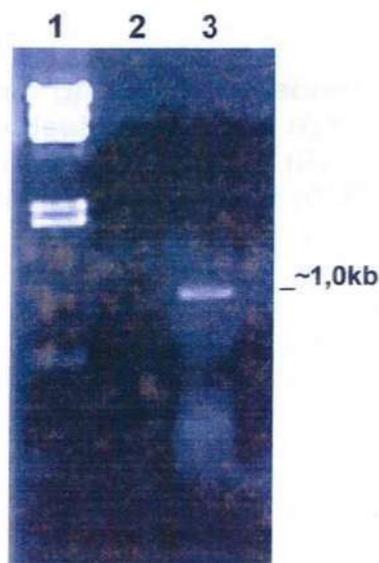


Figura 3.6. PCR do banco de cDNA. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR. Canaletas: (1) marcador de tamanho molecular λ -HindIII; (2) controle negativo da reação; (3) produto do PCR. O número à direita do gel representa o tamanho do amplicon.

3.10 Análise dos transcritos do gene *gpd* de *Metarhizium anisopliae*

Com o intuito de verificar a regulação do gene *gpd* em diferentes condições de cultivo do fungo *M. anisopliae*, seus produtos de transcrição foram analisados por "Northern blot" (2.7.12). RNA foi extraído (2.7.3.3) das condições de cultivo do fungo em glicose e em cutícula do carrapato *Boophilus microplus*, e procedeu-se a hibridização com a sonda do gene *gpd* de *M. anisopliae*. Na Figura 3.7 evidencia-se a regulação aumentada do gene *gpd* na condição de cultivo em cutícula (dados obtidos em colaboração com DUTRA, comunicação pessoal). Como comparação foi utilizado a sonda do gene *tef-1 α* de *M. anisopliae* que se expressa constitutivamente.



Figura 3.7. Transcritos do gene *gpd* de *M. anisopliae* sob duas condições de cultivo: glicose e cutícula. RNA total extraído de meio com glicose e com cutícula. Painel (A) "Northern blot". (B) RNA corado com brometo de etídeo. Canaletas: (GLI) RNA de glicose; (CUT) RNA de cutícula.

4. DISCUSSÃO

O fungo *Metarhizium anisopliae* é considerado um dos organismos mais promissores no controle de carrapatos e de insetos praga da agricultura e tem sido um dos modelos mais estudados em relação ao isolamento, seleção e caracterização de linhagens do ambiente, elucidação dos mecanismos de infecção e desenvolvimento de formulações de biopesticidas. O maior entrave para a utilização de fungos no controle biológico é o maior tempo necessário entre a aplicação e a morte dos hospedeiros, em comparação aos pesticidas químicos. Portanto, um dos objetivos comuns é aumentar a velocidade de morte dos hospedeiros (ST. LEGER *et al.*, 1996).

A caracterização de genes com regiões promotoras fortes, que proporcionam um alto nível de expressão nas células, desperta grande interesse no que diz respeito ao estudo da expressão gênica e funcional nos mais variados sistemas. O isolamento e a construção de fusões de elementos promotores à genes hipoteticamente envolvidos no processo de infecção e morte do hospedeiro pelo patógeno, no caso de *Metarhizium* infecção fungo-artrópodo, constitui uma estratégia muito utilizada para o estudo da função gênica. A construção de vetores de super-expressão, baseados em regiões promotoras homólogas além de fornecer informações básicas essenciais sobre a expressão gênica do organismo fornece uma ferramenta valiosa no desenvolvimento de transformantes mais infectivos com um intervalo menor entre a infecção e a morte do hospedeiro.

O gene, *gpd*, que codifica para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, classicamente conhecida por desempenhar a sua função na via glicolítica, enquadra-se nos parâmetros de gene com região promotora forte com potencial para super-expressão de outros genes. A técnica de RDA, desenvolvida no grupo de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos (DUTRA, *et al.*, comunicação pessoal) para o fungo *Metarhizium anisopliae*, comparando uma condição de infecção com uma condição de desenvolvimento basal permitiu o isolamento de diversos fragmentos de genes, entre eles um de aproximadamente 570pb com alta homologia (entre 85 e 100%) com o gene *gpd* de outros fungos filamentosos como *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Neurospora* (Figura 3.1), entre outros.

Para comprovar se realmente a seqüência do gene *gpd* encontrava-se no genoma de *Metarhizium* procedeu-se a hibridização com DNA genômico utilizando-

se o fragmento de DNA como sonda. O que se verificou foi a presença do gene no genoma do fungo, entretanto apesar da digestão com *Sall* e *XhoI* apresentarem duas bandas com sinal de hibridização, a multiplicidade de cópias não pode ser determinada pela ausência do mesmo padrão no restante das digestões e por se desconhecer toda a seqüência do gene e conseqüentemente todos seus sítios de restrição, existindo a necessidade da repetição do experimento com uma estríngência mais baixa, uma vez que mais de uma cópia por genoma é descrita em outros fungos. Um exemplo clássico é o encontrado na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, onde três cópias do gene são encontradas no genoma (HOLLAND & HOLLAND), assim como no fungo *Mucor circinelloides* os genes *gpd1*, *gpd2* e *gpd3* são descritos (WOLFF & ARNAU, 2002).

Como o intuito de isolar o gene completo, procedeu-se com o "screening" da biblioteca genômica de *M. anisopliae*, o qual rendeu apenas um clone positivo, confirmado por hibridização. Após a liberação do inserto dos "braços" do vetor e hibridização com a sonda do gene *gpd*, padrões de bandas com tamanhos entre 6,0kb e 12,0kb foram verificados. Outras hibridizações com DNA do mesmo clone, porém digerido com diferentes enzimas de restrição e com clivagens duplas foram realizados sem a obtenção de padrões de hibridização de fragmentos de DNA com tamanhos moleculares menores. O elevado tamanho molecular dos fragmentos dificultou a sub-clonagem ao ponto de procurarmos por outras estratégias de clonagem, como a de PCR inverso.

Optamos pela estratégia de PCR inverso pois determinamos a seqüência de nucleotídeos do fragmento de DNA originalmente isolado por RDA, pela rapidez de sua otimização e pelo forte interesse do grupo pela região promotora do gene. A amplificação nos revelou um amplicon de aproximadamente 2,0kb que teve sua identidade com o gene *gpd* confirmada por hibridização e, após a sub-clonagem do mesmo em pUC18 aguarda confirmação por seqüenciamento.

Utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene *gpd* de *Metarhizium* uma outra alternativa também foi possível, a amplificação da seqüência a partir de bancos de cDNA do fungo. Para isso procedeu-se a utilização do oligonucleotídeo T7, que encontra complementaridade em um dos "braços" do vetor, e um dos oligonucleotídeos específicos para o gene em orientação antisenso ao primeiro. Um amplicon de aproximadamente 1,0kb foi obtido e clonado em vetor pUC18 e aguarda confirmação por seqüenciamento. A obtenção da seqüência de cDNA do gene

aumenta a possibilidade de estudos do mesmo, pois possibilita a sua expressão em sistemas heterólogos.

Apesar do gene *gpd* poder ser considerado um gene constitutivo em muitos organismos, existem muitos relatos de sua regulação sob determinadas condições e atribuição de diferentes funções para a proteína GAPDH, principalmente em mamíferos, onde apresenta um grande número de funções não relacionadas à via glicolítica. No fungo *Candida albicans* encontramos a proteína codificada pelo gene *gpd* com uma função não convencional, de ligação a fibronectina e a lâmnina, na parede celular (GOZALBO *et al.*, 1998). Da mesma forma na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, encontramos a proteína codificada por *gpd*, também na parede celular (DELGADO *et al.*, 2001). Relatos de regulação do gene *gpd* em fungos filamentosos também não são raros. Em alguns fungos como *Neurospora* (SHINOHARA *et al.*, 1998) e *Aspergillus* (GREENE *et al.*, 2003) há relatos da regulação do gene em relação ao ciclo circadiano, assim como em *S. cerevisiae* existe a regulação em função da disponibilidade de glicose no meio onde o microrganismo é cultivado (NEWCOMB *et al.*, 2003) e em *Trichoderma* o gene é reprimido durante a conidiação e o micoparasitismo (PUYESKY *et al.*, 1997).

Com vistas a detectar a possível regulação do gene *gpd* em *Metarhizum*, seus transcritos foram analisados utilizando-se duas condições de cultivo com diferentes fontes de carbono. Uma das condições consistiu-se de um meio de cultivo contendo glicose como a única fonte de carbono e a outra utilizando cutícula de *Boophilus microplus* na tentativa de mimetizar uma condição de infecção do fungo em um hospedeiro artrópodo. O que se verificou foi uma expressão aumentada do gene *gpd* na presença de cutícula. Esta regulação poderia ser atribuída à maior dificuldade de obtenção do nutriente de uma fonte mais complexa como a cutícula, que requer um gasto maior de energia devido à mobilização de proteínas responsáveis pela sua degradação quando comparada a uma fonte de nutriente não complexa, como a glicose. A condição de cultivo na presença de cutícula poderia causar uma privação momentânea de nutrientes, devido ao maior tempo e energia necessários para a sua degradação a um nível assimilável, o que exigiria um aumento da expressão de *gpd* para realizar a compensação por ativação da via glicolítica. Outra possibilidade é a da participação da proteína sintetizada pelo gene *gpd* desempenhar alguma função ainda não caracterizada em *M. anisopliae*.

Como perspectiva futura à este trabalho esperamos poder caracterizar o gene *gpd* completamente com o término do seqüenciamento dos seus fragmentos clonados. O isolamento de sua região promotora será uma das metas futuras, tendo em vista a construção a partir dela de vetores para a super-expressão de genes caracterizados em *M. anisopliae*. Outras linhas de análise do gene, porém, são possíveis no que diz respeito à sua regulação sob diferentes condições, como por exemplo sob controle do ciclo circadiano, no processo de infecção do hospedeiro e sobre suas outras possíveis funções e localizações celulares para melhor entendimento dos mecanismos moleculares e bioquímicos ainda não conhecidos do fungo *Metarhizium anisopliae*.

5. CONCLUSÕES

i- O fragmento de DNA de 570pb apresentando homologia entre 85 e 100% com genes *gpd* de outros fungos está contido no genoma de *Metarhizium anisopliae*. A multiplicidade de cópias, entretanto, será determinada em experimentos futuros.

ii- Obtivemos um clone positivo para o gene *gpd* realizando o "screening" da biblioteca genômica de *M. anisopliae* utilizando o fragmento do gene como sonda. A sub-clonagem encontra-se em andamento.

iii- A estratégia de PCR inverso foi utilizada como alternativa para a clonagem do gene devido ao forte interesse em sua região promotora. A amplificação revelou um amplicon de 2,0kb que teve sua identidade com o gene *gpd* confirmada por hibridização. O mesmo foi clonado no vetor pUC18 para determinação da sequência de nucleotídeos.

iv- A amplificação a partir de bancos de cDNA de *M. anisopliae*, utilizando um *primer* específico e o *primer* T7, revelou um amplicon de 1,0kb, que foi clonado no vetor pUC18 para determinação da sequência de nucleotídeos.

v- A análise dos transcritos em diferentes meios de cultivo revelou a expressão aumentada do gene *gpd* na condição de desenvolvimento em cutícula quando comparada à condição de desenvolvimento em glicose. As possíveis explicações para tal evento seriam a ativação da via glicolítica, compensando uma privação momentânea de nutrientes causada pela maior gasto de energia na degradação do substrato complexo; ou a participação da proteína sintetizada pelo gene *gpd* em alguma função ainda não caracterizada em *M. anisopliae*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, T. H., & TIMBERLAKE, W. E. (1990) Developmental repression of growth and gene expression in *Aspergillus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 5405-5409.
- ALLEN, R. W., TRACH, K. A., and HOCH, J. A. (1987) *J Biol Chem* **262**, 649-653.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Research* **25**, 3389-3402.
- ALVES, S. B. (1998) Fungos entomopatogênicos em controle microbiano de insetos. Editora Manole Ltda, p. 1163.
- ALVES, S. B., VIEIRA, S. A., NETO, S. S. (1993) Patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para ovos do carrapato *Boophilus microplus*. 14º Congresso Brasileiro de Entomologia, Piracicaba, p. 344.
- AMIRI, B. (2000) Inter and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp., and its significance to pathogenesis. *Mycol Res* **104**(4), 447-452.
- ASCHOFF, J. (1981) Free-running and entrained circadian rhythms. *J Aschoff (ed.)*, *Handbook of behavioral neurobiology* **4**, 81-92. Plenum Press, Inc., New York, N. Y.
- BAXI, M. D., and VISHWANATHA, J. K. (1995) *Biochemistry* **34**, 9700-9707.
- BELL-PEDERSEN, D., SHINOHARA, M. L., LOROS, J. J. and DUNLAP, J. C. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 13096-13101.
- BERNARD, M., KLEIN, D. C., and ZATZ, M. (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 304-309.
- BIDOCHKA, M. J., ST. LEGER, R. J. and ROBERTS, D. W. (1997) Mechanisms of Deuteromycetes infections in grasshoppers and locusts: an overview. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* **171**, 213-224.
- BITTENCOURT, S. E. T. (1998) Purificação, caracterização parcial e localização de cobre zinco superóxido dismutase (CnZnSOD) do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

- BITTER, G. A. and EGAN, K. M. (1984) Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* from vectors utilizing the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. *Gene* **32**, 263-274.
- BOGO, M. R., QUEIROZ, M. V., SILVA, D. M., GIMÉNEZ, M. P., AZEVEDO, J. L., and SCHRANK, A. (1996) Double-stranded RNA isometric virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res* **100**, 1468-1472.
- BOUCHARA, J. P., TRONCHIN, G., ANNAIX, V., ROBERT, R. and SENET, J. M. (1990) Laminin binding receptors on *Candida albicans* germ tubes. *Infect Immun* **58**, 48-54.
- BRUCE, V. G. (1960) Environmental entrainment of circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **25**, 29-48.
- BURKE, J., ENGHILD, J., MARTIN, M., JOU, Y., MYERS, R., ROSES, A., VANCE, J., and STRITTMATTER, W. (1996) *Nat Med* **2**, 347-350.
- CALDERONE, R. A. (1993) Molecular interactions at the interface of *Candida albicans* and the host cells. *Arch Med Res* **24**, 275-279.
- CALDERONE, R. A. and BRAUN, P. C. (1991) Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* **55**, 1-20.
- CARLSON, M. (1999) Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol* **2**, 202-207.
- CHARRIER-FERRARA, S., CAILLOOL, D. & GOUDOT-CROZEL, V. (1992) Complete sequence of the *Schistosoma mansoni* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene encoding a major surface antigen. *Mol Biochem Parasitol* **56**, 339-344.
- CHAFFIN, W. L., LÓPEZ-RIBOT, J. L., CASANOVA, M., GOZALBO, D. and MARTÍNEZ, J. P. (1997) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 130-180.
- CLARKSON, J. M., & CHARNLEY, A. K. (1996) New insight into the mechanism of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol* **4**(5), 197-203.
- CORREIA, A. C. B., FIORIN, A. C., MONTEIRO, A. C. and VERÍSSIMO, C. J. (1998) Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari:ixodidae) in stabled cattle. *J Invertebr Pathol* **71**, 189-191.
- COX, G. M., TOFFALETTI, D. L., PERFECT, J. R. (1996) Dominant selection system for use in *Cryptococcus neoformans*. *J Med Vet Mycol* **34**, 385-391.

- CUTLER, J. E. (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **45**, 187-218.
- DELGADO, M. L., O'CONNOR, J. E., AZORÍN, I., RENAU-PIQUERAS, J., GIL, M. L. and GOZALBO, D. (2001) The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* *TDH1*, *TDH2* and *TDH3* genes are also cell wall proteins. *Microbiology* **147**, 411-417.
- DERISI, J., IYER, I. and BROWN, P. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**, 680-686.
- DEVEZE-ALVAREZ, M., GARCÍA-SOTO, J. and MARTÍNEZ-CADENA, G. (2001) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is negatively regulated by ADP-ribosylation in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Microbiology* **147**, 2579-2584.
- DOBSON, D. E., GROVES, D. L., & SPIELGELMAN, B. M. (1987) Nucleotide sequence and hormonal regulation of mouse glycerolphosphate dehydrogenase messenger RNA during adipocyte and muscle cell differentiation. *J Biol Chem* **262**, 1804-1809.
- DRIVER, F., MILNER, R. J., TRUEMAN, J. W. H. (2000) A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol Res* **104**, 134-150.
- FAGAN, T., MORESE, D. and HASTINGS, J. W. (1999) Circadian synthesis of a nuclear-encoded chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* is translationally controlled. *Biochemistry* **38**, 7689-7695.
- FALCÃO MOREIRA, R., FERNANDES, P. A. & MORADAS-FERREIRA, P. (1998) *Kluyveromyces marxianus* flocculence and growth at high temperature is dependent on the presence of the protein p37. *Microbiology* **144**, 681-688.
- FERNANDES, P. A., KEEN, J. N., FINDLAY, J. B. C. & MORADAS-FERREIRA, P. (1992) A protein homologous to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is induced in the cell wall of flocculent *Kluyveromyces marxianus*. *Bioch Biophys Acta* **1159**, 67-73.
- FORT, P., MARTY, L., PIECHACZYK, M., EL SABOUTY, S., DANI, C., JEANTEUR, P., and BLANCHARD, J. M. (1985) Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase multi-gene family. *Nucleic Acids Res* **13**, 1431-1442.

- FOULKES, N. S., DUVAL, G., and SASSONE-CORSI, P. (1996) *Nature* **381**, 83-85.
- FRAZZON, A. P. G., DA SILVA VAZ, J. I., MASUDA, A., SCHRANK, A., and VAINSTEIN, M. H. (2000) In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* **93**, 117-125.
- FUKAZAWA, Y. and KAGAYA, K. (1997) Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* **35**, 87-99.
- GANCEDO, J. M. (1998) Yeast carbon catabolic repression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 334-361.
- GAUR, N. K., and KLOTZ, S. A. (1997) Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, *ALA1*, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. *Infect Immun* **65**, 5289-5294.
- GIL, M. L., VILLAMÓN, E., MONTEAGUDO, C., GOZALBO, D. & MARTÍNEZ, J. P. (1999) Clinical strains of *Candida albicans* express the surface antigen glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in vitro and in infected tissues. *FEMS Immunol Med Microbiol* **23**, 229-234.
- GIL-NAVARRO, I., GIL, M., CASANOVA, M., MARTÍNEZ, J. P. & GOZALBO, D. (1997) The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is surface antigen. *J Bacteriol* **179**, 4992-4999.
- GOUDOT-CROZEL, V., CAILLOL, D., DJABALI, M. & DESSEIN, A. J. (1989) The major parasite surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis is a 37kDa glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Exp Med* **170**, 2065-2080.
- GOZALBO, D., GIL-NAVARRO, I., AZORÍN, I., RENAU-PIQUERAS, J., MARTÍNEZ, J. P. & GIL, M. L. (1998) The cell wall associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect Immun* **66**, 2052-2059.
- GREENE, A. V., KELLER, N., HAAS, H., and BELL-PEDERSEN, D. (2003) A circadian oscillator in *Aspergillus* spp. regulates daily development and gene expression. *Eukar Cell* **2**, 231-237.
- HANAUER, A. and MANDEL, J. L. (1984) The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family: Structure of the human cDNA and of an X-chromosome linked pseudogene: Amazing complexity of the gene family in mouse. *EMBO J.* **3**, 2627-2633.

- HIRANO, T., SATO, T., YAEHASHI, K. and ENEI, H. (2000) Efficient transformation of the edible basidiomycete *Lentinus edodes* with a vector using a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter to hygromycin B resistance. *Mo. Gen Genet* **263**, 1047-1052.
- HIRANO, T., SATO, T., OKAWA, K., and KANDA, K. (1999) Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Lentinus edodes*. *Bioscie Biotechnol Biochem* **63**(7), 1223-1227.
- HOCHBERG, M. L. and SARGENT, M. L. (1974) *J Bacteriol* **120**, 1164-1175.
- HOLLAND, J. P., and HOLLAND, M. J. (1980) Structural comparison of two nontandemly repeated yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *The J Biol Chem* **255**(6), 2596-2605.
- HOLLAND, J. P., and HOLLAND, M. J. (1979) The primary structure of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *The J Biol Chem* **254**(19), 9839-9845.
- HOLLAND, M. J. and HOLLAND, J. P. (1979) Isolation and characterization of a gene coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The J Biol Chem* **254**(12), 5466-5474.
- HOLLAND, M. J. and HOLLAND, J. P. (1978) Isolation and identification of yeast messenger ribonucleic acid coding for enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* **17**, 4900-4907.
- HOLLAND, M. J. and WESTHEAD, E. W. (1973) *Biochemistry* **12**, 2276-2281.
- HORWITZ, B. A. & GRESSEL, J. (1983) Elevated riboflavin requirement for postphotoinductive events in sporulation of a *Trichoderma* auxotroph. *Plant Physiol* **71**, 200-204.
- HOSTETTER, M. K. (1994) Adhesins and ligands involved in the interactions of *Candida albicans* with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev* **7**, 29-42.
- HUANG, X. Y., BARRIOS, L. A. M., VONKHORPON, P., HONDA, S., ALBERTSON, D. G. & HECTH, R. M. (1989) Genomic organization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family of *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* **206**, 411-424.
- HUBANK, M. and SCHATZ, D. G. (1994) *Nucleic Acids Res* **22**, 5640-5648.
- HUITOTEL, P. and PANTALONI, D. (1985) *Eur J Biochem* **150**, 265-269.

- JEONG, M., PARK S., KWON H. and BYUN M. (2000) Isolation and characterization of the gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Bioch. and Biophys Res Comm* **278**, 192-196.
- JOHNSTON, M. (1999) Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet* **15**, 29-33.
- KAWAMOTO, R. M., and CASWELL, A. H. (1996) *Biochemistry* **25**, 657-661.
- KAAYA, G. P., MWANGI, E. N. and OUNA, E. A. (1996) Prospects for biological control of livestock tick *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous for *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J Invert Pathol* **67**, 15-20.
- KAY, S. A. (1993) *Semin Cell Biol* **4**, 81-86.
- KLOTZ, S. A. (1994) Plasma and extracellular matrix proteins mediate in the fate of *Candida albicans* in the human host. *Med Hypotheses* **42**, 328-334.
- KLOTZ, S. A., CHEN, R. C., SMITH, R. L. and ROUSE J. B. (1994) The fibronectin adhesin of *Candida albicans*. *Infect Immun* **62**, 4679-4681.
- KLOTZ, S. A., RUTTEN, M. J., SMITH, R. L., BABCOCK, S. R. and CUNNINGHAM, M. D. (1993) Adherence of *Candida albicans* to immobilizes extracellular matrix proteins is mediated by calcium-dependent surface glycoproteins. *Microb Pathog* **14**, 133-147.
- KUCERA, M. (1980) Proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae* toxic for *Galleri mellonella* larvae. *J Invert Pathol* **35**, 304-310.
- LAXALT, A. M., CASSIA, R. O., SANLLORENTI, P. M., MADRID, E. A., ANDREU, A. B., DALEO, G. R., CONDE, R. D., and LAMANTTINA, L. (1996) *Plant Mol Biol* **30**, 961-972.
- LEBHERZ, H. G., and RUTTER, W. J. (1967) *Science* **157**, 1198-1200.
- LISITSYN, N., LISITSYN, N., and WIGLER, M. (1993) *Science* **259**, 946-951.
- LÓPEZ-RIBOT, J. L., CASANOVA, M., MONTEAGUDO, C., SEPÚLVEDA, P. and MARTÍNEZ, J. P. (1994) Evidence for the presence of a high-affinity laminin receptor-like molecule on the surface of *Candida albicans* yeast cells. *Infect Immun* **62**, 742-746.
- LUKYANOV, K., DIATCHENKO, L. CHENCHILK, A., NANISSETTI, A., SIEBERT, P., USMAN, N., MATZ, M. and LUKYANOV, S. (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **230**, 285-288.
- MAITRA, P. K. and LOBO, Z. (1971) *J Biol Chem* **246**, 475-488.

- MANJUNATH, S., and SACHS, M. M. (1997) Molecular characterization and promoter analysis of the maize cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family and its expression during anoxia. *Plant Mol Biol* **3**, 97-112.
- MANSUR, N. R., MEYER-SIEGLER, K., MAURO, D. J., WURZER, J. and SIROVER, M. A. (1993) *Nucleic Acids Res* **21**, 993-998.
- MARTINEZ, P., MARTIN, W., and CERFF, R. (1989) *J Mol Biol* **208**, 551-565.
- MCALISTER, L. and HOLLAND, M. J. (1985) Differential expression of three yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J Biol Chem* **260**(28), 15019-15027.
- MCNULTY, S. E., and TOSCANO, W. A. J. (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **212**, 165-171
- MEYER-SIEGLER, K., MAURO, D. J., SEAL, G., WURZER, J., DERIEL, J. K. and SIROVER, M. A. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 8460-8464.
- MODUM, B., & WILLIAMS, P. (1999) The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect Immun* **67**, 1086-1092.
- NAVARRO, E., RUIZ-PEREZ, V. L., and TORRES-MARTINEZ, S. (2000) Overexpression of the *crgA* gene abolishes light requirement for carotenoid biosynthesis in *Mucor circinelloides*. *Eur J Biochem* **267**, 800-807.
- NÈGRE, E., VOGEL, T., LEVANON, A., GUY, R., WALSH, T. J. and ROBERTS, D. D. (1994) The collagen binding domain of fibronectin contains a high affinity binding site for *Candida albicans*. *J Biol Chem* **269**, 22039-22045.
- NESS, G. C., and PENDLETON, L. C. (1991) *FEBS Lett* **288**, 21-22.
- NEWCOMB L. L., DIDERICH, A. J., SLATTERY, M. G., and HEIDEMAN, W. (2003) Glucose regulation of *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle genes. *Eukar Cell* **2**, 143-149.
- PANCHOLI, V. & FISHETTI, V. A. (1992) A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med* **176**, 415-426.
- PANCHOLI, V. & FISHETTI, V. A. (1993) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on the surface of group A streptococci is also an ADP-ribosylating enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 8154-8158.

- PANCHOLI, V. & FISHETTI, V. A. (1997) Regulation of the phosphorylation of human pharyngeal cell proteins by group A streptococci surface dehydrogenase: signal transduction between streptococci and pharyngeal cells. *J Exp Med* **186**, 1633-1643.
- PASTORIAN, K., HAWEL III, L. and BYUS, C. V. (2000) Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Analy Biochem* **283**, 89-98.
- PENDRAK, M. L., and KLOTZ, S. A. (1995) Adherence of *Candida albicans* to host cells. *FEMS Microbiol Lett* **129**, 103-114.
- PINTO, A. S., BARRETO, C. C., SCHRANK, A., ULHOA, C. J. U. and VAINSTEIN, M. H. (1996) Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Can J Microbiol* **43**, 322-327.
- PUNT, P. J., KRAMER C., KUYVENHOVEN J., POWWEL P. H. and VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. (1992) An upstream activating sequence from the *Aspergillus nidulans gpdA* gene. *Gene* **120**, 67-73.
- PUNT, P. J., DINGEMANSE, M. A., KUYVENHOVEN J., SOEDE, R. D. M., POWWEL, P. H. and VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. (1990) Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans gpdA* gene, encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene* **93**, 101-109.
- PUNT, P. J., DINGEMANSE, M. A., JACOBS-MEIJSSING, J. M., POWWELS, P. H., and VAN DE HONDEL, C. A. M. J. J. (1988) Isolation and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* **69**, 49-57.
- PUNT, P. J., OLIVER, R. P., DINGEMANSE, M. A., POWWELS, P. H. & VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. (1987) Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin b resistance marker from *Escherichia coli* gene. *Gene* **56**, 117-124.
- PUYESKY, M., PONCE-NOYOLA, P., HORWITZ, B. A. and HERRERA-ESTRELA, A. (1997) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in *Trichoderma harzianum* is repressed during conidiation and mycoparasitism. *Microbiology* **143**, 3157-3164.
- QUAIL, E. A., and YEOH, G. C. T. (1995) *FEBS Lett* **359**, 126-128.
- REDKAR, R. J., HERZOG, R. W., and SINGH, N. K. (1998) Transcriptional activation of the *Aspergillus nidulans gpdA* promoter by osmotic signals. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2229-2231.

- RONAI, Z. (1993) *Int J Biochem* **25**, 1073-1076.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. and MANIATIS, T. (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. CSHL.
- SANTONI, G., BIRARELLI, P., JIN-HONG, L., GAMERO, A., DJEU, J. Y., and PICCOLI, M. (1995) An $\alpha 5\beta 1$ -like integrin receptor mediates the binding of less pathogenic *Candida* species to fibronectin. *J Med Microbiol* **43**, 360-367.
- SANTONI, G., GISMONDI, A., LIU, J. H., PUNTURIERE, A., SANTONI, A., FRATI, L., PICCOLI, M., and DJEU, J. Y. (1994) *Candida albicans* expresses a fibronectin receptor antigenically related to $\alpha 5\beta 1$ integrin. *Microbiology* **140**, 2971-2979.
- SCHRANK, A., BASSANESI, M. C., PINTO J. H., COSTA, S. V., BOGO, M. R., and SILVA, M. S. N. (1993) Superoxide dismutase in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Ciência e Cultura* **45**, 200-205.
- SCHUREN, F. H. J., HARMSSEN, M. C. and WESSELS, J. G. (1993) A homologous gene-reporter system for the basidiomycetes *Schizophyllum commune* based on internally deleted homologous genes. *Mol Gen Genet* **238**, 91-96.
- SERLUPI-CRESCENZI, O., KURTZ, M. B. & CHAMPE, S. P. (1983) Developmental defects resulting from arginine auxotrophy in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **129**, 3535-3544.
- SHERLOCK, I. A., & GUITTON, N. (1982) Observações sobre a ação do fungo *Metarhizium anisopliae* Metsch. sobre algumas espécies de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) *Rev Inst Med Trop* **24**, 234-239.
- SHINOHARA, M. L., LOROS, J. J., and DUNLAP, J. C. (1998) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is regulated on a daily basis by the circadian clock. *J Biol Chem* **273**, 446-452.
- SILVA, J. C., & MESSIAS, C. L. (1986) Virulence of mutants and revertants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* toward *Rhodnius prolixus*. *J Invertebrat Path* **48**, 368-374.
- SINGH, R., and GREEN, M. (1993) *Science* **259**, 365-368.
- SIROVER, M. A. (1999) New insight into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* **1432**, 159-184.

- SIROVER, M. A. (1997) Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology. *J Cell Biochem* **66**, 133-140.
- SOKOLOWISKY, V., KALDENHOFF, R., RICCI, M., RUSSO, V., (1990) Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Newsletter* **37**, 41.
- ST. LEGER, R. J., JOSHI, L., BIDOCHKA, M. J. & ROBERTS, D. W. (1996) Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 6349-6354.
- ST. LEGER, R. J., ROBERTS, D. W., and STAPLES, R. C. (1991) A model to explain differentiation of apressoria by germlings of *Metarhizium anisopliae*. *J Invert Pathol* **57**, 299-310.
- ST. LEGER, R. J., BUTT, T. M., STAPLES, R. C., and ROBERTS, D. W. (1990) Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Gen Microbiol* **136**, 1779-1789.
- ST. LEGER, R. J., BUTT, T. M., STAPLES, R. C., and ROBERTS, D. W. (1989). Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experim Mycol* **13**, 253-262.
- ST. LEGER, R. J., DURRANDS, P. K., CHARNLEY, A. K. and COOPER, R. M. (1988) Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *J Invert Pathol* **52**, 285-293.
- ST. LEGER, R. J., DURRANDS, P. K., COOPER, R. M., and CHARNLEY, A. K. (1988) Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Arch Microbiol* **41501**, 413-416.
- ST. LEGER, R. J., COOPER, R. M. and CHARNLEY, A. K. (1986) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *J Gen Microbiol* **132**, 1509-1517.
- SUGAHARA, T., SHIRAHATA, S., SASAKI, T., and MURAKAMI, H. (1995) *FEBS Lett.* **368**, 92-96.
- SUN, X. H., TSO, J. Y., LIS, J. & WU, R. (1988) Differential regulation of the two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes during *Drosophila* development. *Mol Cell Bio* **8**, 5200-5205.

- TEMME, A., OTT, T., HABERBERGER, T., TRAUB, O., and WILLECKE., K. (2000) Acute-phase response and circadian expression of connexin26 are not altered in connexin32-deficient mouse liver. *Cell Tissue Res* **300**, 111-117.
- TULLOCH, H. (1976) The Genus *Metarhizium anisopliae*. *Trans Br Mycol Soc* **66**, 407-411.
- VARMA, A. and KWON-CHUNG, K. J. (1999) Characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate gene and the use of its promoter for heterologous expression in *Cryptococcus neoformans*, a human pathogen. *Gene* **232**, 155-163.
- VILLAMÓN, E., GOZALBO, D., MARTÍNEZ, J. P. & GIL, M. L. (1999) Purification of biologically active recombinant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **179**, 61-65.
- WADA, J., KUMAR, A., OTA, K., WALLNER, E. I., BATLLE, D. C. and KANWAR, Y. S. (1997) *Kidney Int* **51**, 1629-1638.
- WARNER, J. R. (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* **24**, 437-440.
- WATERHAM, H. R., DIGAN, M. E., KOUTZ, P. J., LAIR, S. V., and CREGG, J. M. (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* **186**, 37-44.
- WINRAM, S. B. & LOTTENBERG, R. (1998) Site-directed mutagenesis of streptococcal plasmin receptor protein (Plr) identifies the C-terminal Lys³³⁴ as essential for plasmin binding, but mutation of the *plr* gene not reduce plasmin binding to group A streptococci. *Microbiology* **144**, 2025-2035.
- WINRAM, S. B. & LOTTENBERG, R. (1996) The plasmin-binding protein Plr of group A streptococci is identified as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Microbiology* **142**, 2311-2320.
- WOLFF, A. M. and ARNAU, J. (2002) Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloide* (Syn. *racemosus*) and use of the *gpd1* promoter for recombination protein production. *Fungal Gen Biol* **35**, 21-29.
- ZHIOUA, E., BROWING, M., JONHSON, P. W., GINSENSBERG, H. S. and LEBRUM, R. A. (1997) Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari:ixodidae). *J Parasitol* **83**, 815-818.

7. ANEXO

O trabalho em anexo foi submetido para publicação em julho de 2003 e refere-se a utilização da técnica de RDA na identificação de ESTs expressas em *Metarhizum anisopliae* durante o processo de infecção no hospedeiro modelo.

Trabalho submetido para publicação no Fungal genetics and Biology em julho de 2003 sob o número FGBI154.

Application of RDA to identify ESTs expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle.

Valéria Dutra¹, Luciano Nakazato¹, Leonardo Broetto¹, Irene Silveira Schrank^{1,2},
Marilene Henning Vainstein^{1,3}, Augusto Schrank^{1,2*}

¹Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia.

³Departamento de Microbiologia.

*Corresponding author: *Augusto Schrank, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.*

Phone: (051) 3316-6071

Fax (051) 3316-7309

E-mail: augusto@dna.cbiot.ufrgs.br

Index descriptors: *Metarhizium anisopliae*, *Boophilus microplus*, RDA, biocontrol.

Abstract

Metarhizium anisopliae is a well-characterized biocontrol agent of a wide range of plagues, including insects and acari. To identify genes involved in the infection process, a representational difference analysis (RDA) was performed, using cDNA generated from germinated conidia of *M. anisopliae* in tick *Boophilus microplus* cuticle and cDNA generated during fungus growth in glucose rich medium. Sequence determination of approximately 500 clones and comparison analysis using public databases allowed the identification of 33 sequences and 14 ESTs with known orthologs. As expected, almost all identified sequences show significant similarity to other fungal genes. The diversity of gene clusters found reflects the participation of several proteins in the early infection process of *M. anisopliae* in the cattle tick *B. microplus*.

1. Introduction

The fungus *Metarhizium anisopliae* have been extensively studied as a key regulatory organism as a biocontrol agent. It is the best-characterized entomopathogen used to control insect pests in sugar cane plantations in Brazil on a commercial scale and has a potential application against the bovine tick *Boophilus microplus* (Frazzon et al., 2000). *M. anisopliae* infects insects and ticks via a combination of specialized structures and cuticle degradation and hydrolytic enzymes are considered key factors for the penetration step (Charnley & St Leger, 1991; Clarkson & Charnley, 1996). The search for pathogenicity determinants has demonstrated that the process is multifactorial (St Leger et al., 1991; Kershaw et al., 1999). Host specificity is an important aspect to be addressed and the study of the proteins produced during infection is important to discover those with a role in the penetration process. To date, only a few potential *M. anisopliae* virulence factors have been examined in detail, and most of them consist of proteases and chitinases (St. Leger et al., 1996; Gillespie et al., 1988; Screen et al., 2001; Gimenez-Pecchi et

al., 2002; Krieger de Moraes et al., 2003). Recently an EST survey has analyzed two varieties of *Metarhizium*, however the multitude of sequences found (c. 2000 different genes) calls for the application of more specific methodologies to discover genes directly involved in the pathogenic process (Freimoser et al., 2003).

Representational difference analysis (RDA) in its original form was designed to identify differences between genomic DNA populations (Lisityn et al., 1995). This methodology was subsequently modified to allow the analysis of differences in expressed mRNA populations (Hubank & Schatz, 1994). Based on successive rounds of subtractive hybridization followed by PCR, RDA enriches for, and permits the isolation of differentially expressed mRNAs, while simultaneously remove uninteresting (non-differentially expressed) mRNAs. This is a powerful and sensitive tool for the identification of differentially expressed genes and renders the isolation of both, up- and down-regulated genes, expressed in two different cDNA populations (Pastorian and Craig, 2001). The application of this approach to systems like *M. anisopliae* and its hosts may allow the characterization of genes involved in the host infection process. In this work, we used tick cuticle and glucose based medium to generate *M. anisopliae* cDNA populations, respectively. The differences between the two cDNA populations were analyzed by RDA and have identified the genes up-regulated during cuticle degradation and other genes involved in stress response, detoxification, trans-membrane transport and appressorium formation.

2. Material and Methods

2.1. Strain and culture conditions

M. anisopliae E6 was originally from the Microbial Genetics Group Collection (Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, USP, Brazil). The fungus was routinely grown at 28°C in Cove's medium (NaNO₃ 0.6% w/v) supplemented with 1% glucose (w/v), named "driver" or in Minimal medium (KH₂PO₄ 0.1% w/v; MgSO₄ 0.05%) supplemented with 10% (w/v) *B. microplus* cuticle, named "tester", during 18 h incubation on a rotatory shake platform (180 rpm). Cuticle was prepared by dissection of *B. microplus* ingurgitated females, extensively washed with sterile water, sonicated to disrupted tick cells, and sterilized by autoclaving. Mycelium was collected and washed with sterile water.

2.2. RNA extraction and DNA synthesis

Total RNA was extracted from "tester" and "driver" cultures using the protocol described by Sokolovsky et al. (1990). First strand cDNA synthesis was performed with reverse transcriptase (RT Superscript II, Invitrogen, California, USA) using 1 µg of RNA. First strand cDNA (2 µl) was used as template to synthesize the second strand of cDNA. cDNA was prepared using the SMART PCR cDNA synthesis kit by Clontech Laboratories (Palo Alto, C.A, USA). All oligonucleotides were purchased from Invitrogen.

Oligonucleotides (5' - 3') for cDNA synthesis were:

cDNA AGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG;

CDS AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT₍₃₀₎N₁N

where (N = A, C, G or T; N₁ = A, G or C);

PCR II AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT.

Oligonucleotides (5' - 3') for RDA were:

JBam12 GATCCGTTTCATG;

JBam24 ACCGACGTCGACTATCCATGAACG;

NBam12 GATCCTCCCTCG;

NBam24 AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG;

RBam12 GATCCTCGGTGA, RBam24 AGCACTCTCCAGCCTCTCTCACCGAG.

2.3. Representational Difference Analysis (RDA)

The DNA fragments for RDA were generated according to the modified protocol previously described by Pastorian and Craig (2001). Double stranded cDNA (1 µg) was digested with *Sau3A* restriction enzyme (Amershan Pharmacia Biotech, Amershan Place, UK). The resulting products were purified using GFX kit (Amershan Pharmacia Biotech, Amershan Place, UK), and ligated to adapters (RBam-12/24 adapters). To obtain suitable starting material for the RDA the cDNAs were diluted and amplified using RBam-24 as primer (20 cycles of 45 sec at 95°C and 3 min at 72°C, each). The final PCR products were purified using the GFX kit and resuspended to 500 ng/µl. Both "tester" and "driver" representations were digested with *Sau3A* to remove the adapters and purified using GFX kit prior to ligation of the NBam-12/24 adapter.

For selective amplification subtractive hybridization was performed according to Pastorian and Craig (2001). Briefly, for the generation of the first differential product (DP1), "driver" and "tester" cDNAs were mixed at a 10:1 ratio, hybridized for

24 h at 67° C, and amplified by PCR with NBam-24 primer (7 cycles of 45 sec at 95° C and 3 min at 72° C, each). PCR products were reamplified in an additional PCR step (20 cycles) to remove unwanted single stranded cDNAs. A final PCR amplification step produced DP1. To generate the second differential products (DP2), JBam adapters replaced the NBam adapters and the "driver" to "tester" ratio was raised to 100:1.

2.4. Cloning and Sequence analysis

An aliquot of the final RDA products (DP2 fragments) was filled-in with Klenow fragment and phosphorylated with T4 polynucleotide kinase (Amershan Pharmacia Biotech, Amershan Place, UK) added of 1mM ATP. Upon heat inactivation, the samples were purified using GFX kit and ligated to *Sma*I-digested and dephosphorylated pUC18 vector. *E. coli* XL1 Blue competent cells were transformed with the ligation products. Plasmid DNA was prepared from selected clones and sequenced with the Dyenamic ET Dye Terminator cycle sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis systems (Amershan Pharmacia Biotech, Amershan Place, UK), using the primers corresponding to the pBluescript vector. Phred program was utilized to base-calling nucleotide cDNA clones (Ewing et al, 1998) and vector sequence was removed manually. The resulting sequences were compared to the Genbank database using the BLASTN program (Altschul, 1997).

2.5. Northern-blot analysis

Total RNA (20µg) was fractionated by electrophoresis in 1.2% agarose-formaldehyde gels and transferred to nylon filters (Life Technologies, MD, USA). Filters were hybridized to subtracted labeled cDNA clones (Gene Images labeling kit, Amershan Pharmacia Biotech, Amershan Place, UK) and/or to a *M. anisopliae tef1-α* gene as control of loaded RNA. In all experiments, the cDNA probe was purified using GFX kit.

3. Results and Discussion

A RDA approach was used to identify genes expressed during the penetration steps of *M. anisopliae* in the tick *B. microplus* cuticle. The stage of the fungal development on the tick cuticle was followed by Scanning Electron Microscopy (SEM) (Fig. 1), to ensure that the extracted RNA was prepared from fungal infection

structures onto the tick cuticle rather than from fungus developing on the media liquid phase, at the expenses of soluble cuticle degradation byproducts.

Differently from the work by Freimoser et al. (2003), this strategy enriches the resulting clone library with sequences corresponding to genes potentially involved in the fungal differentiation during cuticle penetration. Moreover, our experiment simulates the natural infection process in which the fungus starts the infection from spores and not from mycelia. cDNAs were synthesized from two sets of cultures: (i) the "driver" condition (named GLU), in which *M. anisopliae* spores were inoculated into 1% glucose containing media, representing a condition where the fungus has enough soluble carbon source available and most of the already characterized pathogenicity determinants are repressed (e.g. genes for proteases, *pr1A*, *pr1B* and *pr1C*; chitinases, *chi1* gene, Bogo et al, 1998; Screen et al, 2001, Krieger et al, 2003) and (ii) the "tester" condition (named CUTICLE), in which the spores were inoculated in a medium containing phosphate buffer and *B. microplus* cuticles. Cuticles were prepared as described in Material and methods and special care was taken, by cell disruption, to avoid tick RNA contamination. The critical step to generate differentially expressed clones is the RNA preparation from cuticle containing cultures, since the fungus represents a minor fraction in relation to the mass of cuticle. As a control, a reverse experiment was conducted, in which the "driver" condition was RNA from cuticle culture and the "tester" condition was RNA from glucose culture. Although in the starting material of both groups of experiments, a smear of cDNA products was detected, a different amplified DNA fragment pattern was evident after two cycles of RDA, using different "driver" to "tester" ratios, as depicted in Fig. 2.

The resulting RDA fragment populations were cloned into pUC18 vector, generating approximately 600 independent clones with an average length of 400bp. Approximately 500 randomly picked clones were sequenced and the comparison analysis, using public databases, led us to identify 33 known sequences and 14 ESTs. The corresponding genes and ESTs were clustered by sequences and similarities to genes with known function previously described. ESTs with E values $<10^{-5}$ were grouped into functional categories, as outlined in Tables 1 and 2.

As expected, most clones show significant similarity to other fungal genes and a few with bacteria as *Bradyrhizobium japonicum*. Our main focus was aimed at cDNAs encoding proteins that may be involved in the fungus-host interactions. Northern blot analyses of three genes indicate that selection of differentially

expressed sequences was successfully achieved (Fig. 3) and up-regulation occurs (shown for *gpdh* and *pr1C* genes) in the presence of tick cuticle. Dot blots also displayed a differential hybridization pattern when clones from the two conditions ("tester" and "driver") were probed with DP2 products from CUTICLE and GLU (Fig. 4). The level of transcripts corresponding to cDNA clones was altered in the presence of cuticle, suggesting that these genes may be involved in *Metarhizium* pathogenicity.

Many of the genes found here were already described in *Metarhizium* or orthologs in other systems. Some of these genes have suggested roles during infection processes. Among these genes we found the *pr1C* gene from *M. anisopliae*, a subtilisin-like protease *Pr1* isoform, which solubilizes the proteinaceous host cuticle, assisting penetration of the fungal hyphae and providing nutrients for further growth. The *pr1C* gene is under dual control of a general carbon catabolite repression/derepression mechanism and a carbon source (cuticle) specific induction mechanism (St. Leger, et al., 1996; Freimoser, 2003). The *pth11p* gene from *Magnaporthe grisea*, a pathogenicity gene encoding a trans-membrane protein that is an upstream effector of appressorium differentiation was also found (DeZwaan et al., 1999).

β -1,3 exoglucanase genes from a variety of fungi seem to have different functions. These enzymes are described to take part in morphogenetic / morpholytic processes during fungal development and differentiation. They are also implicated in mobilizing β -glucans under conditions of exhaustion of carbon and energy sources, functioning as autolytic enzymes. In addition, exoglucanases are involved in fungal pathogen-host interaction (De La Cruz et al., 1995). The study of glucanases in fungi and plants over the past decades has led to the hypothesis that their original function might have been to promote cell growth and division of unicellular organisms involved in the turnover of cell wall β -glucans (Simmons, 1994; Mcleod et al., 2003).

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) genes have been considered to encode classical cytosolic glycolytic proteins. However, recent evidence demonstrates that mammalian GAPDH displays diverse activities, which are unrelated to glycolysis, in different sub-cellular locations. In some microbial species, GAPDH has been found on the cell surface, where it may have various roles (Delgado, 2001) and is also present at the surface of *Candida albicans* cells in infected tissues, thus supporting the contention for a role of this protein *in vivo*, such as binding to host tissues (Gil et al., 1999). During cuticle infection by *Metarhizium*,

GPDH could play a similar role in adhesion to tick cuticle in early stages of appressorium development and attachment.

Genes coding transaldolases were found with a high redundancy among the cuticle library (Table 1). Transaldolase is a key enzyme of the non-oxidative branch of the pentose-phosphate pathway and it is important to generate high levels of NADPH and it is also suggested to be involved in Reactive Oxygen Species (ROS) detoxification (Vatanaviboon et al., 2002). Moreover, in *Trichoderma reesei* a 2D protein analysis, comparing mycelium cell envelope proteins with high and low levels of secreted protein, both GPDH and transaldolase were detected (Lim et al., 2001).

In addition to these genes, with more evident relation to the host penetration process, a variety of sequences related to antioxidant proteins were present. These include catalases and HSP70, which are involved in fungal pathogenicity to animals and plants. Such proteins may also provide protection for invertebrate pathogens against active oxygen species generated as part of the host defense response (Iwagana & Kawabata, 1998; Freimoser, 2003).

This is the first report of RDA application in entomopathogenic fungi. The gene expression profile observed gives a new insight to the host-pathogen relationship. A range of genes, coding from well-characterized proteases to structural and metabolic proteins that may participate in the early phases of the host-infection process, was revealed. Functional and regulation studies of these genes, by knockout and over-expression, may contribute to a more global understanding of *M. anisopliae* infection process.

Acknowledgments

We thank the Universidade Federal do Mato Grosso, CAPES/PICDT, CNPq, PADCT, and FAPERGS. We are grateful to Dr. Henrique B. Ferreira for reading the manuscript and for his valuable comments and criticisms.

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Research* 25, 3389-3402
- Bogo, M.R., Rota, C.A., Pinto, H., Ocampos, M., Correa, C.T., Vainstein, M.H., Schrank, A., 1998. A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Current Microbiology* 37, 221-225.
- Charnley, A.K., St. Leger, R.J. 1991. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: Cole ET, Hoch HC (eds) *Fungal spore disease initiation in plants and animals*. New York, London: Plenum Press, pp: 267-287.
- Clarkson, J.M., Charnley A.K., 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiol.* 4, 197-203
- De La Cruz, J., Pintor-Toro, J., Benitez, T., Llobell, A., Romero, L., 1995. A novel endo-B-1,3-glucanase, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzanium*. *J. Bacteriol.* 177, 6937-6945.
- De La Paz Gimenez-Pecchi, M., Bogo, M.R., Santi L., Moraes, C.K., Correa, C.T., Henning Vainstein, M., Schrank A., 2002. Characterization of mycoviruses and analyses of chitinase secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*. *Curr Microbiol.* 45, 334-339.
- De Zwaan, T.M., Carroll, A.M., Valent, B., Sweigard, J., 1999. *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *The Plant Cell* 11, 2013-2030.
- Delgado, M.L., Óconnor, J., Azorin, I., Renau-Piqueras, J., Gil, M., Gozalbo, D., 2001. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* *TDH1*, *TDH2* and *TDH3* genes are also cell wall proteins. *Microbiology* 147, 411-417.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8, 175-85.

- Frazzon, A., Vaz Junior, I., Masuda, A., Schrank, A., Vainstein, M., 2000. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* 94, 117-125.
- Freimoser, F.M., Screen, S., Bagga, S., Hu, G., St. Leger, R.J., 2003. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity i insect hosts. *Microbiology* 149, 239-247.
- Gil, M., Villamón, E., Monteagudo, C., Gozalbo, D., Martinez, J., 1999. Clinical strains of *Candida albicans* express the surface antigen glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase *in vitro* and in infected tissues. *FEMS Immunology and Microbiology* 23, 229-234.
- Gillespie, J.P., Bateman, R., Charnley, A.K., 1998. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *J. Invert. Pathol.* 71, 128-137.
- Hubank, M., Schatz, D., 1994. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Research* 22, 5640-5648.
- Iwanaga, S., Kawabata, S., 1998. Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab. *Front Biosci* 3, 973-984.
- Kershaw, M.J., Moorhouse, E.R., Bateman, R., Reynolds, S.E., Charnley, A.K., 1999. The role of dextruxins in the patogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *J. Invert. Pathol.* 74, 213-223.
- Kim, S.; Zeller, K.; Dang, C.; Sandgren, E.; Lee, L., 2001. A strategy to identify differentially expressed genes using representational difference analysis and cDNA arrays. *Analytical Biochemistry* 288, 141-148.
- Krieger de Moraes, C.M., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2003. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Current Microbiology* 46, 205-210.

- Lim, D., Hains, P., Walsh, B., Bergquist, P., Nevalainen, H., 2001. Proteins associated with the cell envelope of *Trichoderma reesei*: a proteomic approach. *Proteomics* 7, 899-909.
- Lisitsyn, N.A., Lisitsyn, N., Wigler, M., 1995. Representational difference analysis: finding the differences between genomes. *Science* 11, 303-307.
- Mcleod, A., Smart, C., Fry, W., 2003. Characterization of 1,3-B-glucanase and 1,3;1,4-B-glucanase genes from *Phyphthora infestans*. *Fungal Genet. Biol.* 38, 250-263.
- Pastorian, K., Hawel III, L., Byus, C.V., 2000. Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Analytical Biochemistry* 283, 89-98.
- Screen, S.E., Hu, G., St Leger, R.J., 2001. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acidum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca Sexta*. *J. Invert. Pathol.* 78, 260-266.
- Simmons, C.R., 1994. The physiology and molecular biology of plant 1,3-B-D-glucanases and 1,3:1-4-B-D-glucanases. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 13, 325-387.
- Sokolowisky, V., Kaldenhoff, R., Ricci, M., Russo, V., 1990. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Newsletter.* 37, 41.
- St Leger, R.J., Roberts, D.W., Staples, C.R., 1991. A model to explain differentiation of apressoria by germlings of *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Pathol.* 57, 299-310.
- ST Leger; R., Joshi, L., Bidochka, M., Roberts, D., 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing atoxic protease. *Proceedings National Academy of Science* 93, 6349-6354.
- Vatanaviboon, P., Varaluksit, T., Seeanukun, C., Mongkolsuk, S., 2002. Transaldolase exhibits a protective role against menadione toxicity in

Xanthomonas campestris pv. *Phaseoli*. Biochemical and Biophysical Research Communications 297, 968-973.

Fig. 1. Scanning electron microscopy (SEM) of tick cuticle infected by *M. anisopliae*. *B. microplus* cuticles infected with *M. anisopliae* conidia, used for RNA extraction (18 h post-infection), were examined by SEM. The micrograph shows the stage of germ-tube development. Arrows indicate the conidia and germ-tube.

Fig. 2. RDA products analyzed by gel-electrophoresis. RNA was extracted from *M. anisopliae* grown in glucose containing media (GLU) and from cuticle containing media (CUTICLE). Total cDNA and the products of the first (DPN1) and second RDA rounds (DPN2) were loaded. Lanes (M) molecular markers (numbers on the left indicate size in bp); (2) total cDNA from GLU; (3) DPN1 from GLU; (4) DPN2 from GLU; (5) total cDNA from CUTICLE; (6) DPN1 from CUTICLE and (7) DPN2 from CUTICLE.

Fig. 3. Northern blot analysis of specific clones from CUTICLE library. Total RNA, used for cDNA synthesis and RDA extracted from both GLU and CUTICLE, as in Fig. 2, was loaded and hybridized against labeled *pr1C* gene probe. (II) *gpdh* gene probe and (III) *tef-1 α* gene probe (control). Panel A. Northern analysis. Panel B. Ethidium bromide stained RNA. Lanes: (GLU) RNA from GLU (20 μ g); (CUT) RNA from CUTICLE (20 μ g). (I).

Fig. 4. Dot blot analysis of *M. anisopliae* cDNA RDA clones. Individual plasmid cDNA clones were blotted in serial dilutions (1 to 6). Clones from CUTICLE library: HSP 70 (heat shock protein); PR1C (protease); FHAb (flavo-hemoglobin). Clones from GLUCOSE library: CAT (catalase); P-450 (cytochrome). Panel (GLUCOSE), Hybridized to labeled DP2 products from CUTICLE cultures. Panel (CUTICLE), hybridized to labeled DP2 products from GLU cultures.

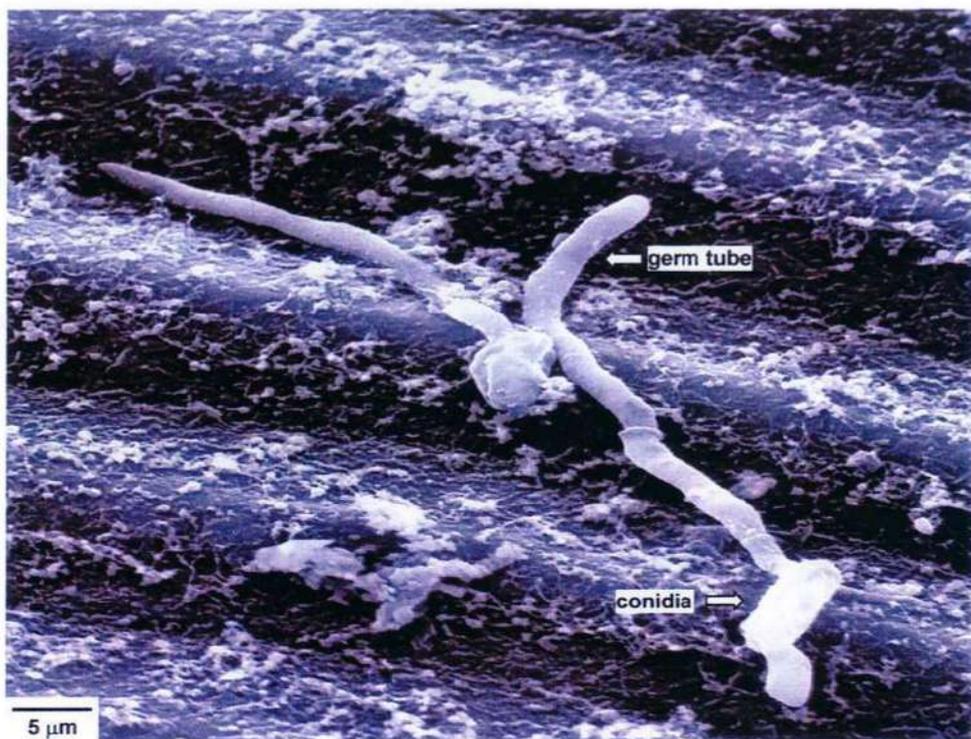


Fig. 1

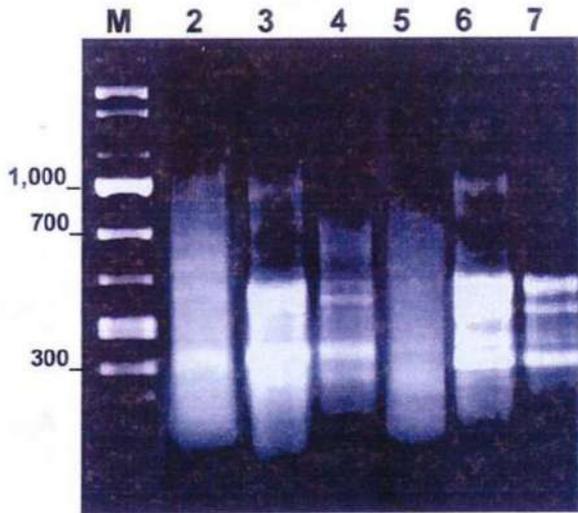


Fig. 2

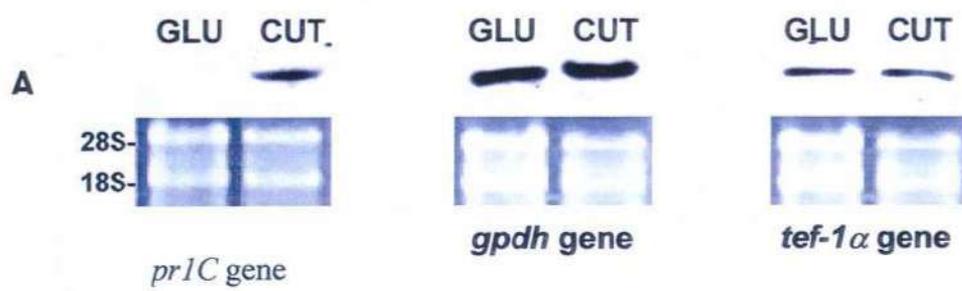


Fig. 3

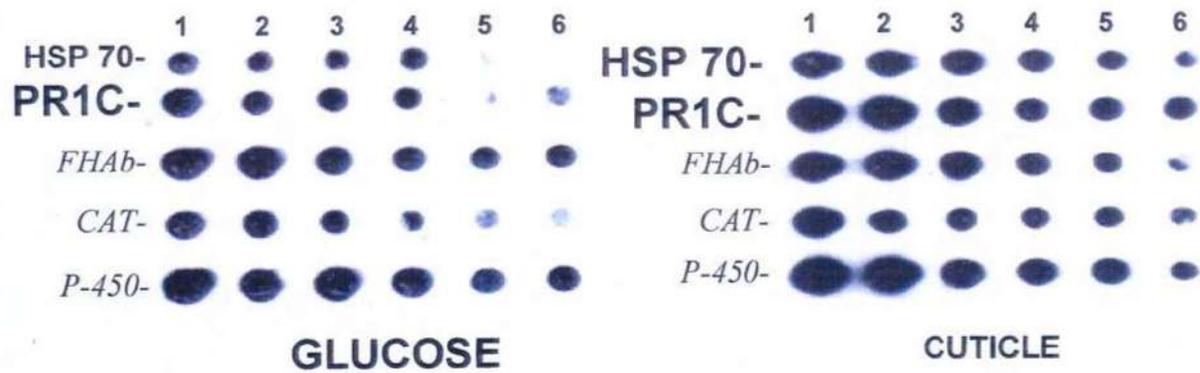


Fig. 4

TABLE 1. Summary of BLAST search of sequenced clones isolated from tick cuticle grown *M. anisopliae* with significant homologies

Cluster	Description	Species	Accession No.	Clone redundancy	Blast similarity
1. Cell metabolism					
Metabolism of Complex Carbohydrates	β -1,3 exoglucanase	<i>Trichoderma harzianum</i>	AJ002397	1	1e-18
Metabolism of Other Amino Acids/Glutathione metabolism	\square -glutamyltransferase related protein	<i>Neurospora crassa</i>	CAB91242	1	4e-22
Metabolism Amino Acids	cobalamin-independent methionine synthase	<i>Aspergillus nidulellus</i>	AF275676	1	3e-23
	cystathionine-gamma-lyase	<i>Acremonium chrysogenum</i>	AF286193	2	1e-99
Metabolism of Other Amino Acids	\square -glutamyltranspeptidase	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	AF535133	2	7e-06
	S-adenosylmethionine synthetase	<i>Neurospora crassa</i>	NCU21547	1	2e-87
Metabolism of Complex Lipids	transaldolase	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	CAA18994	23	2e-39
	ferredoxin-like iron-sulfur subunit of mitochondrial complex I	<i>Neurospora crassa</i>	X95547	1	2e-54
Energy Metabolism	phosphoenolpyruvate carboxykinase	<i>Emericella nidulans</i>	AY049067	1	1e-65
	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Claviceps purpurea</i>	X73282	13	2e-74
2. Protein metabolism					
Proteolysis	pr1C subtilisin-like	<i>Metarhizium anisopliae</i>	AJ419628	1	1e-94
3. Cell structure and function					
	Integral membrane protein (PTH11)	<i>Magnaporthe grisea</i>	AF119670	3	6e-08
4. Stress response					
	Flavohemoglobin	<i>Fusarium oxysporum</i>	AB016807	10	4e-39
	major stress-inducible 70 kDa heat shock protein	<i>Neurospora crassa</i>	U10443	3	4e-19

5. Others

67 kDa Myosin-crossreactive streptococcal antigen homolog	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	NP_766665	1	4e-39
Mitotic control protein (dis3+)	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	M74094	1	5e-42
Crh-like protein	<i>Aspergillus fumigatus</i>	AY169706	2	2e-14
rAsp f9 allergen	<i>Aspergillus fumigatus</i>	AJ223327	1	2e-09
AJ273088	<i>Metarhizium anisopliae</i>	AJ273088	2	7e-44
BQ142708	<i>Metarhizium acridum</i>	BQ142708	3	6e-10
AJ273718	<i>Metarhizium anisopliae</i>	AJ273718	2	1e-75
AJ274294	<i>Metarhizium anisopliae</i>	AJ274294	5	9e-39
AJ272764	<i>Metarhizium anisopliae</i>	AJ272764	11	6e-48
AJ273445	<i>Metarhizium anisopliae</i>	AJ273445	1	1e-64
AJ272751	<i>Metarhizium anisopliae</i>	AJ272751	1	7e-16
AJ274081	<i>Metarhizium anisopliae</i>	AJ274081	3	6e-45
AJ272778	<i>Metarhizium anisopliae</i>	AJ272778	1	5e-50
AJ272762	<i>Metarhizium anisopliae</i>	AJ272762	1	7e-24
AJ273837	<i>Metarhizium anisopliae</i>	AJ273837	2	8e-05
AJ273615	<i>Metarhizium anisopliae</i>	AJ273615	1	3e-06
AJ274153	<i>Metarhizium anisopliae</i>	AJ274153	1	4e-54

TABLE 2. Summary of BLAST search of sequenced clones isolated from glucose grown *M. anisopliae*

Cluster	Description	Species	Accession No.	Clone redundancy	Blast similarity
1. Cell Metabolism					
Amino acid metabolism	ornithine decarboxylase	<i>Neurospora crassa</i>	M68969	1	2e-33
Nucleotide metabolism	GTP-binding protein (gtp1) gene	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	BAA13797	1	6e-07
	adenosine-5'-phosphosulfate kinase	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	AAK00577	1	2e-41
Carbohydrate Metabolism	pyruvate dehydrogenase like gene	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	X75648	5	2e-07
2. Protein metabolism					
Proteolysis	trypsin-related protease	Metarhizium anisopliae	AF130865	1	2e-79
3. RNA metabolism					
RNA modification	glycine-rich protein	<i>Coccidioidis immitis</i>	AF403297	6	1e-18
4. Cell structure and function					
Transport proteins	Neutral amino acid permease (mtr) gene	<i>Neurospora crassa</i>	L34605	1	1e-23
	H ⁺ -exporting plasma membrane	<i>Neurospora crassa</i>	P07038		2e-62
5. Stress response					
Synthesis of toxic secondary metabolites	trichothecene gene cluster	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	AF359360	3	2e-11
Detoxification	Putative thiol-specific antioxidant protein	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	AF312927	4	4e-28
	catalase	<i>Claviceps purpurea</i>	CAA04716	1	9e-43
	mpVI T9 pisatin demethylase gene	<i>Nectria haematococca</i>	L20976	1	1e-05
6. Others					
	isobutene-forming enzyme and benzoate 4-hydroxylase	<i>Rhodotorula minuta</i>	D63703	1	3e-22
	cytochrome P-450	<i>Fusarium oxysporum</i>	M63340	1	3e-45
	AJ273974	<i>Metarhizium anisopliae</i>		1	3e-30