

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Análise funcional da região 5' flanqueadora do gene *chit1* de
*Metarhizium anisopliae***

Dissertação de Mestrado

CAROLINA PEREIRA SILVEIRA

Porto Alegre, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Análise funcional da região 5' flanqueadora do gene *chit1* de
*Metarhizium anisopliae***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Carolina Pereira Silveira

Orientador: Prof. Augusto Schrank

Porto Alegre, 2007

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Augusto Schrank, por toda paciência com minhas falhas, além da orientação, apoio e atenção fornecidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a Marilene Vainstein pela co-orientação.

À comissão de acompanhamento Prof^a Dr^a. Irene Schrank e o Prof. Dr. Henrique Ferreira.

À relatora da dissertação Prof^a Dr^a. Irene Schrank.

Aos colegas do Laboratório 217, Charley, Juliano, Broetto, Lenise, Tati, Ângela e Lis, pela paciência, ensinamentos e companheirismo.

Aos colegas dos laboratórios 222 e 220, em especial a Juli, Irina, Letícia, Lívia, Roberta, pela amizade constante e valiosa.

Aos amigos e demais colegas do Centro de Biotecnologia.

À diretoria, coordenação e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do CBiot/UFRGS.

Aos meus familiares que acreditam na minha capacidade, agradeço pelo incentivo, amor e pela compreensão da minha ausência.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	VI
LISTA DE FIGURAS	VIII
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	9
MANUSCRITO	10
Abstract	11
1. Introduction	12
2. Materials and Methods	13
2.1. Organisms and culture conditions	13
2.2. DNA manipulations	13
2.3. RNA manipulation	14
2.4. Protein extraction, gel electrophoresis, and immunoblotting	14
2.5 <i>Metarhizium anisopliae chit1</i> gene constructs	15
3. Results	15
4. Discussion	18
5. Reference list	21
6. Figure legends	23
7. Figures	25
DISCUSSÃO	31
CONCLUSÕES	42
PERSPECTIVAS	43
REFERÊNCIAS	44

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
α- ³² P	Fósforo 32 radioativo
<i>B-TUB</i>	Gene da β-tubulina
ARE	Fator GATA envolvido na regulação de genes da via do metabolismo de nitrogênio em <i>A. nidulans</i>
BAR	Gene de fosfinotricina acetiltransferase de <i>Streptomyces hygroscopicus</i>
BSA	Albumina sérica bovina C
BP	Acido citidílico
BP	Pares de bases
cDNA	Seqüência de DNA complementar
cm	Centímetro
CHIT30	Quitinase codificada pelo gene chit1 de <i>Metarhizium anisopliae</i>
CHIT36	Endoquitinase de <i>Trichoderma harzianum</i>
CHIT42	Quitinase codificada pelo gene chit1 de <i>Metarhizium anisopliae</i>
CREA	Proteína reguladora envolvida na repressão catabólica de carbono
CHIT42	Quitinase codificada pelo gene chit1 de <i>Metarhizium anisopliae</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTP	Desoxirribonucleosídeo (s) trifosfato (s)
DTT	Ditiotreitol
ECH42	Endoquitinase de <i>Trichoderma atroviride</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético, sal sódico
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
GlcNac	N-acetilglicosamina
h	Hora
IgG	Imunoglobulina
kDa	Quilodaltons = 1.000 Daltons
MC	Meio de Cove
mg	Miligrama
min	Minuto
ml	Mililitro

mM	Milimolar
NaNO ₃	Nitrato de sódio
PacC	Regulador transcricional de muitas vias sensíveis ao pH
ORF	<i>Open reading frame</i>
PCR	Reação em cadeia da DNA-polimerase
PEG	Polietilenoglicol
Pgpd	Promotor do gene Gliceraldeído-3-fosfato-de-desidrogenase de <i>A. nidulans</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da DNA-polimerase por transcrição reversa
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS/PAGE	Dodecilsulfato de sódio/eletroforese em gel de poliacrilamida
sGFP	<i>Green fluorescent protein</i> utilizada para expressão em plantas
STRE	regulador transcricional de muitas vias sensíveis ao estresse osmótico
TATA Box	Sítio de ligação para RNA polimerase II
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
trpC	Triptofano C TtrpC Terminador do gene de Triptofano C de <i>A. nidulans</i>
uORF	Pequena <i>open reading frame</i>
var.	Variedade
w/v	Peso por volume

LISTA DE FIGURAS

Figure 1	The <i>chi1</i> gene 5' flanking region map and constructs.	25
Figure 2	Constructs confirmation and transformants	27
Figure 3	Southern blot analysis of transformants of <i>M. anisopliae</i> DNA hybridized with labeled 750 bp PCR fragment (sGFP).	28
Figure 4	Analysis of GFP expression by RT-PCR and Western blot.	29
Figure 5	Comparison of the pattern of transcription and translation of the transformants in colloidal chitin 0.4%, 0.8% and glucose 1%.	30
Figura 1	Modelo proposto para regulação da transcrição do gene <i>chi1</i> por mecanismo de competição.	41

INTRODUÇÃO

Fungos entomopatogênicos são capazes de infectar e matar uma ampla gama de insetos e muitos são usados em programas de controle biológico, tornando-se uma alternativa ao uso de pesticidas químicos. Porém, o efeito de biocontrolador destes organismos não é imediato, não evitando, assim, os danos causados pela praga. Para que ocorra a morte rápida do hospedeiro, ainda é necessário aliar, ao uso de biocontrolador, pesticidas químicos.

Estudos estão sendo feitos para identificar os determinantes de patogenicidade e entender o processo de infecção, visando a gerar linhagens de fungos mais eficientes, que causem a morte mais rápida do hospedeiro e evitam o uso de produtos químicos prejudiciais ao meio ambiente.

Metarhizium anisopliae é um ascomiceto que vem sendo utilizado no controle de grande número de insetos-praga, como carrapatos, cigarrinha da cana-de-açúcar e das pastagens (Frazzon *et al.*, 2000). Trabalhos recentes apontam para o uso potencial de *Metarhizium* no controle do mosquito vetor da malária, pois, além de causar uma alta taxa de mortalidade, causa redução na alimentação e na fecundidade, afetando, assim, a probabilidade do mosquito *Anopheles gambiae* transmitir a doença (Scholte *et al.*, 2006). A espécie *M. anisopliae* é dividida em cinco variedades: *M. anisopliae* (Metsch) var. *anisopliae* (Tulloch), *M. anisopliae* (Metsch) var. *majus* (Johnston) (Liu *et al.*, 2001), *M. anisopliae* (Metsch) var. *acridum*, *M. anisopliae* (Metsch) var. *lepidiotum* (Dong) e *M. anisopliae* (Metsch) var. *dcjhyium* (Dong) (Dong *et al.* 2006).

Este fungo penetra ativamente através da cutícula do hospedeiro, sendo, por isso, alvo de muitos estudos para tentar entender como ocorre o processo de infecção. Tem sido sugerido que o processo de penetração é multifatorial. Primeiramente, ocorre a adsorção e adesão do esporo à superfície do hospedeiro, seguida da germinação e penetração na cutícula (Arruda *et al.*, 2005; Pedrini *et al.*, 2006). O processo de penetração ocorre pela ação sinérgica de várias enzimas juntamente com a pressão mecânica exercida pela formação do apressório, levando ao rompimento da cutícula. Porém, sabe-se muito pouco dos fatores responsáveis pela interação fungo-hospedeiro.

A análise de ESTs de duas variedades de *M. anisopliae* identificou algumas enzimas como proteinases, quitinases, fosfolipases, esterases, lipases e fosfatases, com potencial função no processo de patogenicidade (Freimoser *et al.*, 2003).

O gene que codifica a protease Pr1A em *M. anisopliae* foi identificado como um fator de virulência (St Leger *et al.*, 1996). Quando cópias múltiplas do gene *pr1A*, fusionadas a um promotor constitutivo, foram inseridas em *M. anisopliae*, a eficiência no processo de infecção foi aumentada, ocorrendo uma redução de 25% no tempo necessário para matar larvas de *Manduca sexta* em comparação com a linhagem selvagem (St Leger *et al.*, 1996).

Dutra *et al.*, (2004) identificaram seqüências e ESTs diferencialmente expressas por *M. anisopliae* durante a multiplicação em cutícula de *Boophilus microplus*, mimetizando o processo de infecção. Neste trabalho foram identificados vários genes já descritos em *M. anisopliae* e genes ortólogos aos de outros fungos. Entre esses genes destacam-se os que codificam: protease do tipo subtilisina (gene *pr1C*), uma proteína provavelmente envolvida na diferenciação de apressório (*pth11*), uma transaldolase e uma proteína de choque térmico / chaperona.

Silva *et al.*, (2004) detectaram a participação da endo/exoquitinase CHIT30 produzida por *M. anisopliae* durante o processo de penetração na cutícula de *Boophilus microplus*, determinando, assim, a função desta quitinase no processo de infecção.

St. Leger *et al.* (2006) identificaram um gene altamente expresso em hemolinfa de insetos que codifica uma proteína colágeno, denominada MCL1 com função desconhecida. A análise da expressão deste gene, em cultivos com hemolinfa de diversos insetos, confirmou a participação da MCL1 no processo de infecção. Além disso, um mutante nulo gerado para o gene *mcl1*, foi mais rapidamente atacado pelo sistema imune do hospedeiro, mostrando redução na virulência contra *Manduca sexta*. Este resultado indica que proteína MCL1 seria um importante determinante de patogenicidade em *M. anisopliae*.

Quitinases são produzidas por uma grande variedade de organismos e possuem importância fisiológica e funções ecológicas. Em fungos, as quitinases participam da morfogênese da parede celular, incluindo germinação dos esporos, alongamento e ramificação da hifa, bem como na disponibilização

dos produtos da degradação da quitina, já que esta é insolúvel e, portanto, não pode ser usada diretamente como nutriente (Ike *et al.*, 2006).

Três genes que codificam quitinases foram caracterizados até o presente momento em *M. anisopliae var. anisopliae*. O gene *chit1* foi isolado por Bogo *et al.*, (1998) e codifica uma proteína de 42 kDa. Este gene apresenta uma ORF de 521 pb, é interrompido por três pequenos íntrons e está presente como cópia única no genoma deste fungo. O gene *chi2* possui uma ORF de 1.542 pb e também codifica uma proteína de 42 kDa (Baratto *et al.*, 2006) e o gene *chi3* codifica uma endo/exoquitinase CHIT30 (Silva *et al.*, 2004).

Uma das estratégias usadas para verificar a participação de quitinases no processo de infecção por fungos entomopatogênicos é através da superexpressão dessas quitinases. Fang *et al.* (2005) demonstraram que a superprodução de uma endoquitinase Bbchit1 de *Beauveria bassiana* não só reduziu o tempo de vida como também aumentou a eficiência de infecção contra pulgões (*Myzus persicae*). Por outro lado, a superexpressão da quitinase CHIT42 de *M. anisopliae* apresentou pouco ou nenhum efeito na virulência contra *Manduca sexta* (Screen *et al.*, 2001).

A expressão de quitinases em fungos parece ser controlada por um sistema de indução/repressão, na qual a quitina ou seus produtos de degradação agem como indutores e a glicose e outras fontes de carbono, facilmente metabolizáveis, agem como repressores. Muitos sítios de ligação consensuais para fatores de transcrição são encontrados em promotores de genes de quitinases, dentre eles, o motivo consensual para a proteína CREA (Barreto *et al.*, 2004)

Alguns estudos demonstram o efeito de diferentes fontes de carbono na síntese e secreção de quitinases em alguns fungos. Bogo *et al.* (1998) verificaram que a expressão do gene *chit1* em *M. anisopliae* não era detectada quando o fungo era multiplicado em presença de glicose 1% ou GlcNac 1%, mas que em presença de quitina 0,8%, ocorria a indução desta quitinase. Já a expressão do gene *chi2* é disparada em situações de depleção de nutrientes e em presença de cutícula e quitina (Baratto *et al.*, 2006).

A análise das proteínas secretadas por *M. anisopliae* revelou alto nível da quitinase CHIT30 em culturas de quitina 1%, cutícula 1% e 0,25% de GlcNac. Em contraste, cultivos em glicose 1% ou altas concentrações de

GlcNac (acima de 1%) não tiveram níveis detectáveis desta quitinase (Silva *et al.*, 2004). Tem sido demonstrado que a quitinase CHIT30, codificada pelo gene *chit3*, apresenta regulação similar a quitinase CHIT42, codificada pelo gene *chit1*, estando sob regulação positiva, onde a presença de um indutor é necessária para a expressão.

A análise da seqüência 5' não codificadora de muitos genes de quitinases identifica numerosos sítios de ligação consensuais para fatores de transcrição que têm sido associados com a regulação de quitinases ou outras enzimas que degradam polissacarídeos.

Chit33 é uma endoquitinase envolvida no micoparasitismo do fungo *Trichoderma harzianum*. Sua expressão ocorre durante o crescimento em quitina, parede celular de *Rhizoctonia solani*, monômeros de quitina, depleção de fontes de carbono e nitrogênio (altas concentrações bloqueiam a expressão de *chit33*) (Kubicek *et al.*, 2001). O promotor do gene *chit33* de *Trichoderma harzianum* contém um provável elemento TATA box a -108; um sítio consensual para ligação do regulador de nitrogênio HGATAR, a -365 e -704 e sítios de ligação para o repressor CREA (5'SYGGRG3'), a -156, e para reguladores de resposta ao estresse, a -511.

A expressão de dois genes de quitinases de *Trichoderma atroviride*, o gene *ech42* e *nag1*, foi estudada por Mach *et al.*, (1999). A expressão destes genes foi observada quando este fungo foi cultivado em presença de parede celular de *Botrytis cinerea*. A indução da expressão do gene *nag1* também ocorre em presença de GlcNac. Diferentemente, a expressão do gene *ech42* foi disparada pela depleção de fontes de carbono e estresse metabólico, indicando que outros componentes da parede da célula do hospedeiro são necessários para degradação de quitina. (Mach *et al.*, 1999).

A expressão da endoquitinase *chit36* produzida por *Trichoderma asperellum*, é regulada tanto por glicose quanto por níveis de nitrogênio. Mesmo quando existe no meio uma concentração alta de glicose e baixa de nitrogênio, ocorre expressão desta quitinase. A depleção de nitrogênio como fator de indução da expressão de quitinases também tem sido observada nos genes *chit33*, *nag1* e *ech42*. Condições de estresse, como temperaturas extremas e estresse osmótico, quitina coloidal e GlcNac são indutores do gene *chit36* (Viterbo *et al.*, 2002). A presença de altas concentrações de glicose e

glicerol inibiu a expressão de genes de quitinases como *ech42*, *chit36*, *chit33* e *nag1* (Chuan, 2006).

Na região promotora do gene *chit36* de *T. asperellum*, foram identificados sítios para ligação da proteína repressora CreA/Cre1, a -449 e na orientação oposta a -737 e -744. O motivo consensual HGATAR para ligação do regulador de nitrogênio foi encontrado a -542 e -514. Os sítios de ligação para elementos responsáveis pela expressão de genes que respondem a condições de estresse foram encontrados a -599 e -713 (Viterbo *et al.*, 2002).

Chi46 é uma quitinase produzida pelo fungo *Trichoderma reesei* cultivado em presença de GlcNac após 12h de incubação ou após 36h em presença de quitina coloidal. Essa diferença no tempo de indução/secreção da quitinase Chi46 pode ser atribuído ao fato desta enzima estar envolvida no processo de morfogênese da parede da célula e não no processo de infecção. Por outro lado, a expressão deste gene é disparada em presença de glicose após trinta e seis horas de cultivo, indicando que a sua expressão pode ser iniciada pela desrepressão de glicose ou depleção desta fonte de carbono do meio (Ike *et al.*, 2006).

A análise da região 5' não-traduzida do gene de quitinase *chi46* de *Trichoderma reesei* identificou uma seqüência TATA box localizada a -144; motivos de consenso para ligação de repressores catabólitos como CRE (5'SYGGRG3') localizados a -360 e -115 do ATG; sítios consensuais para ligação do regulador de nitrogênio AREA (5'HGATAR3'), localizado a -252 e -187; sítios para regulador de pH PacC (5'GCCARG3') a -232 e -133; e um sítio para o regulador da conidiogênese, Br1A (5'MRAGGGR3'), localizado a -347 (Ike *et al.*, 2005).

Takaya *et al.* (1998) isolaram e caracterizaram uma quitinase de *Rhizopus oligosporus*, denominada *chi3*, diferencialmente expressa durante o crescimento da hifa. A produção desta quitinase não aumentava quando quitina coloidal era acrescida ao meio de cultivo e diminuía quando o micélio era transferido para um meio que continha baixa concentração de fontes de carbono e nitrogênio.

Fang *et al.* (2005) purificaram uma endoquitinase denominada Bbchit1, de culturas líquidas de *Beauveria bassiana* crescidas em meio contendo quitina

coloidal. A produção desta endoquitinase em cultivos suplementados com quitina coloidal foi detectada após 24h de cultivo. Quando glicose foi adicionada em meio com quitina coloidal, ocorreu a supressão da produção de Bbchit1.

Kubicek *et al.* (2005) testaram o perfil de transcrição de diversas quitinases produzidas por *Hypocrea jecorina* (teleomórfico de *Trichoderma reesei*) em presença de glicose, quitina coloidal, parede celular de *Rhizoctonia solani*, GlcNac e depleção de fontes de carbono, nitrogênio e em ensaios de confronto. Dois genes de quitinases (*chi18-10* e *chi18-13*) apresentaram um nível de transcrição basal em quitina, GlcNac e depleção de nutrientes. Diferentemente, outro gene de quitinase (*chi18-5*) apresentou e indução nestas condições de cultivo, indicando, assim, uma diversidade funcional das quitinases em *T. reesei*.

A análise da seqüência 5' não codificadora das quitinases de *Trichoderma reesei*, permitiu a identificação de numerosos sítios consensuais para os fatores de transcrição AbaA (5'CATTAY3'), Br1A (5'MRGAGGGR3'), AREA (5'WGATAR3'), Cre1 (5'SYGGRG3'), PacC (5'GCCARG3') e STRE (5'AGGGG3') (Kubicek *et al.*, 2005).

Em presença de glicose, muitos microorganismos reprimem a expressão de um grande número de genes requeridos para utilização de fontes de carbono menos favoráveis. Em fungos, ocorre um mecanismo de repressão por glicose similar ao de bactérias. Existem várias proteínas envolvidas neste tipo de repressão, como, por exemplo, Mig1 (repressor em leveduras), Tup1, Hxk2 (Ronne, 1995). Em fungos filamentosos, a repressão da transcrição de genes por glicose é regulada pelo repressor de catabólito de carbono CREA. CREA é uma proteína que contém motivos de ligação ao DNA dedos de zinco, e reconhece seqüências específicas curtas (5' SYGGRG 3') no promotor de sistemas- alvo, impedindo a transcrição desses genes (David *et al.*, 2005).

Vários ortólogos do gene *crea* de *A. nidulans* foram identificados em outros fungos. Kück and Jekosch (2000) isolaram e caracterizaram o gene *cre1* de *Acremonium chrysogenum*. A seqüência deduzida da proteína CRE1 apresenta alta similaridade com seqüências de aminoácidos de outros repressores de fungos filamentosos. O nível de transcrição do gene que

codifica esta proteína é aumentado em presença de glicose, sofrendo, portanto, autoregulação positiva. Diferentemente do que ocorre com a expressão do gene *cre*, isolado e caracterizado em *Trichoderma reesei* por Strauss *et al.*, (1995) e em *A. nidulans*. (Dowzer e Kelly, 1991), que sofrem auto-regulação negativa, onde, em presença de glicose, as proteínas CRE se ligam em sítios consensuais na região 5' não-traduzida.

Screen *et al.* (1997) identificaram o gene *ccr1* em *M. anisopliae* que codifica uma proteína homóloga às proteínas CREA de *A. nidulans*, *A. niger*, *T. reesei* e *T. harzianum*. Experimentos de complementação demonstraram que CCR1 pode parcialmente substituir a função de CREA em *A. nidulans*.

Screen *et al.* (1998) analisaram a região 5' do gene *pr1*, que codifica uma serino-endoproteínase produzida durante a formação do apressório, e encontraram sítios que apresentavam similaridade com sítio de ligação das proteínas CREA e AREA, sugerindo um mecanismo molecular conservado entre alguns fungos para o controle da patogenicidade em presença de fontes de carbono e nitrogênio.

A repressão por glicose é um fenômeno comum na regulação de genes de quitinases em fungos. Porém, existem também outros mecanismos de regulação de quitinases, como, por exemplo, *splicing alternativo*, identificado em transcritos dos genes *chi18-3* e *chi18-13* de *Trichoderma reesei* (Kubicek *et al.*, 2005).

Apesar de muitos estudos demonstrarem que a repressão por glicose ocorre pela ligação da proteína CREA em sítios consensuais dos promotores, existem genes envolvidos em outros processos biológicos, como por exemplo, a autólise, que sofrem repressão por fontes de carbono mas de uma maneira independente de CREA.

A autólise é observada em muitos fungos filamentosos em culturas com estágio avançado de crescimento, sendo causada pelo envelhecimento do micélio, morte celular programada, diferenciação da hifa, limitação de nutrientes ou estresse físico (Yamazaki *et al.*, 2006).

Emri *et al* (2006) demonstraram que as hidrolases (quitinases e proteinases) produzidas durante a autólise, são reprimidas por fontes de carbono como glicose ou seus derivados. A regulação dos genes que codificam estas hidrolases ocorre independente da proteína CREA, pois em mutantes

nulos do gene *creA*, em presença de glicose, ainda ocorreu repressão por fonte de carbono.

Construções

Com o intuito de caracterizar os elementos *cis*-atuantes encontrados na análise *in silico* na região 5' flanqueadora do gene *chit1*, César Baratto (2001) utilizou a estratégia de PCR para gerar diferentes fragmentos desta região. Foram utilizados os primers PF1 e PR2 para amplificar toda a região flanqueadora mapeada. Os primers PF2 e PR2 foram utilizados para gerar uma deleção de 393 pb na região flanqueadora (excluindo os prováveis elementos CREA). O par de primers PF3 e PR2 foram utilizados para gerar uma deleção de 576 na região 5' flanqueadora (sem os prováveis elementos CREA, GATA) e o par de primers PF1 e PR1 foram utilizados para gerar uma deleção de 198 pb na região 3' da região flanqueadora em relação ao sítio de início de transcrição (sem o provável TATA box e CT Box). Todos os primers construídos continham sítios de restrição para as enzimas *Sma*I e *Xba*I para garantir uma clonagem direcional. Os fragmentos gerados foram clonados nos sítios para as enzimas de restrição *Sma*I (5') e *Xba*I (3') no plasmídeo pUC18. No sítio de *Xba*I deste novo vetor, foi inserido a ORF do gene repórter *sgfp* com terminador de *trpC*. O cassete de seleção, contendo o gene *bar* que confere resistência glifosinato de amônia, sob o promotor constitutivo do gene *gpd* e terminador de *trpC* de *Aspergillus nidulans*, foi inserido no sítio de *Pst*I. Cada vetor contendo uma das construções, foi transformado em *M. anisopliae* pelo método de protoplasto PEG/CaCl₂

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi identificar os elementos *cis*-atuantes essenciais para a regulação do gene *chit1* de *M. anisopliae* em resposta à diferentes fontes de carbono. Para isto, foram feitas deleções na região 5' flanqueadora do gene *chit1* e estas foram fusionadas à região codificadora do gene-repórter *sGFP*, cuja expressão de transcritos e proteína foi analisada.

Objetivos Específicos

- Comparar a expressão do gene repórter em diferentes fontes de carbono.
- Verificar se as deleções geradas no promotor do gene *chit1* alteram a expressão do gene-repórter em diferentes fontes de carbono.
- Identificar possíveis elementos reguladores presentes na região promotora do gene *chit1*.
- Relacionar a expressão do gene-repórter com a presença ou ausência de prováveis elementos reguladores.

Functional analysis of the *Metarhizium anisopliae* *chit1* gene 5'-flanking region

Carolina Pereira Silveira ¹, César Baratto ¹, Marilene Vainstein ¹, Augusto Schrank^{1*}

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

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

Phone: +55 (51) 3316-6079;

Fax +55 (51) 3316-7309.

e-mail: aschrank@cbiot.ufrgs.br

Abstract

The filamentous fungus *Metarhizium anisopliae* is a biocontrol agent against a variety of insects and acari that cause important economic losses in agriculture. The infection process occurs via mechanical pressure and production of several cuticle-degrading enzymes, including chitinases, probably involved in pathogenesis. The timing of gene expression of such enzymes is crucial at the successful infection. Here we studied the role of putative control elements in the expression of the *chit1* gene, which codes for one of these chitinases in *M. anisopliae*. To characterize *cis*-acting elements, deletions in the 5' flanking region of the *chit1* gene were constructed and their functionality was assessed at the transcription/translation level using the sGFP gene as reporter. The deletion of the 372 bp region upstream of the transcription start site (*Pchit1-372*) did not abolish the expression of the *chit1* gene, while, a deletion of 567 bp abolished sGFP expression. The deletion of 198 bp including a putative TATA box caused only a small decrease in sGFP expression. The comparison of each construct in response to glucose and colloidal chitin demonstrated that the *chit1* gene is not repressed in the presence of glucose.

Key words: regulatory elements; promotor; *chit1*; *M. anisopliae*

1. Introduction

Metarhizium anisopliae is one of the best characterized entomopathogens. The fungus infects the host by direct penetration of the cuticle that is facilitated by a combination of mechanical force via a pre-essarium formation and secretion of hydrolytic enzymes (such as chitinases, proteases and lipases), which are proposed to be important for the initiation of the infection process (Moraes *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004). The main focus of the research using this pathogen is to characterize genes important for the infection process aiming to contribute for the selection of improved strains for biocontrol. Most of the genes proposed to be relevant for the infection process are tightly regulated, but little is known about the regulatory sequences that control gene expression in *Metarhizium*.

In fungi, chitinases have a physiological role such as germination of spores, tip growth, branching, and autolysis. Moreover, chitinases may also be important for nutrient acquisition, in mycoparasitism and entomopathogenicity (Fang *et al.*, 2006).

Three of the chitinase genes were cloned and characterized in *M. anisopliae*: the *chit1* gene, that codes a 42-kDa endochitinase, the *chi2* gene that also codes a 42-kDa chitinase; and, the *chi3* gene that codes for an endo/exo-acting 30-kDa chitinase (Bogo *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2004). Their roles in pathogenesis is still not fully understood. The CHIT30 chitinase (*chi3* gene) is produced during the infection of ticks (Silva *et al.*, 2004). The overexpression of the *chi1* gene (ortholog of *chit1* gene) from *M. anisopliae* var. *acridum* did not altered virulence to *Manduca sexta* suggesting that wild-type levels of chitinase are not limiting for cuticle penetration (Screen *et al.*, 2001). On the other hand, in *Beauveria bassiana* the overproduction of the chitinase Bbchit1 enhanced the virulence for aphids in comparisons to that of the wild-type strain (Fang *et al.*, 2005).

Fan *et al.* (2007) fused the chitinase Bbchit1 to chitin binding domains (BmChBD) that, in bioassays with aphids 23% reduction in time to death as compared to the wild-type fungus.

M. anisopliae produces extracellular chitinases on cultures with chitin and low concentrations of N-acetylglucosamine (GlcNAc) as substrate. Conversely, when glucose and high concentrations of GlcNAc are the carbon source chitinase activity is reduced, suggesting an induction/repression mechanism (Barreto *et al.*, 2004).

The *chit1* and *chi3* genes are up regulated by chitin, tick cuticle and low concentrations of GlcNAc (0.25%) and are down-regulated by either high GlcNAc (1%) or glucose (1%) concentrations (Bogo *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2004). The *chi2* gene is upregulated by chitin and also in conditions of fungus autolysis, and is downregulated by glucose (Baratto *et al.*, 2006).

Sequence analysis of the 5' noncoding region of *Trichodema reesei* chitinase genes have identified numerous consensus binding sites for fungal transcription factors previously associated with the regulation of chitinases (Seidl *et al.*, 2005). These consensus binding sites could also be present in the 5' noncoding regions of the *M. anisopliae* chitinase genes.

The aim of this study was the identification of *cis*-acting elements essential for the regulation of the *M. anisopliae chit1* gene. Deletions of the 5' flanking region of the *chit1* gene were constructed and fused to the reporter protein sGFP to locate controlling elements through transcription and translation analysis.

2. Materials and methods

2.1. Organisms and culture conditions

Metarhizium anisopliae strain E6, isolated from *Deois flavopicta* in Espirito Santo State, Brazil, and transformants were maintained on Cove's medium (MC) as previously described (Pinto *et al.*, 1997).

To repress or induce chitinase production, conidia (10^6 ml⁻¹) from *M. anisopliae* were inoculated into 500ml-flasks with 50ml of minimal medium using (w/v) NaNO₃ 0.6% as nitrogen source and (w/v) glucose 1% or (w/v) colloidal chitin 0.4% as carbon source. The flasks were incubated at 28°C on a rotating shaking platform (150 rpm) for 72 h.

2.2. DNA extraction and manipulation

All DNA manipulations were carried out according to standard procedures (Sambrook and Russel, 2001). *M. anisopliae* genomic DNA was extracted according to Bogo *et al.* (1998). Southern hybridizations were performed with the Gene Images Kit (GE Healthcare), according to the manufacture's instructions. PCR reactions were performed with primers SGFPF (5'TCTAGATGGTGAGCAAGGGCG3') and PanDown (5'TCCAGATTCGTCAAGCTGTTTGA3'), that amplify the *sgfp* sequence. The deletions of the 5' flanking region were analyzed by PCR reactions with primers PanDown (5'TCCAGATTCGTCAAGCTGTTTGA3') and M13 (5'GTTTTCCCAGTCACGAC3'). The PCR products were resolved through electrophoresis in 0.8% agarose gels.

2.3. RNA manipulation

Total RNA was extracted as described by Dutra *et al.* (2004). Genomic DNA contamination was removed by RQ1 RNase- free DNase (Promega) and control PCR reactions were performed to confirm DNA removal using the following primers: CHIT1F- 5'GCTGTCTACTTCACCAATTG3' and CHIT1R- 5'CCACGTCCACCCTCCAAT3'. cDNA synthesis was conducted with M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) using 1µg of RNA and 3' BD SMART CDS Primer II A (Clontech Laboratories). PCR were accessed with 1µl of the first-strand cDNA using DNA *Taq*-polymerase (CENBIOT/UFRGS, Porto Alegre, Brazil) and the primers SGFPF and PanDown (see 2.2). As internal control for RNA loading in the RT-PCR reactions, primers for the β - *tubulin* gene (β -*tub*: TUBF- 5'GTAACCAAATCGGTGCTGCT3' and TUBR- 5'CGACGGAGAATGTAGCCATC3') were employed.

2.4. Protein extraction, gel electrophoresis, and immunoblotting

Dry mycelia were suspended in 100mg/ml lysis buffer (5mM DTT, 100mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 5µg/ml benzamidin, 5µg/ml antipain, 5µg/ml leupeptin) and ground using a mortar and pestle in liquid nitrogen, according to Fernández-Ábalos (1998). The homogenates were clarified by centrifugation for 15 min at 14,000 rpm. The total protein content was

determined by the Bradford method using BSA as standard and determined in 0.85 mg/ml (Bradford, 1986).

Electrophoresis under denaturing conditions (SDS/PAGE) was performed according to Laemmli (1970). For Western-blot analysis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes and probed with rabbit anti-GFP antibody (Invitrogen) at a 1:1,500 dilution, and then revealed with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Harbour and Lane, 1988).

2.5. *Metarhizium anisopliae chit1* gene constructs

In silico analysis of the 5' *chit1* gene flanking region was performed using Genomatix (www.genomatix.de) and Promotor Scan (thr.cit.nih.gov/molbio/proscan) programs.

Various lengths of the flanking region of the *chit1* gene were obtained by PCR amplifications. The DNA fragments were cloned, separately, into the SmaI site of pUC18 vector. Plasmid pANGFP (Fernandez-Abalos *et al.*, 1998) was the template to generate the amplicon *sgfp::TrpC* with XbaI site and cloned into pUC18 vector with the *chit1* gene 5' flanking constructs. The selection cassette, contained, the *bar* gene, coding a phosphinothricin acetyltransferase (glufosinate ammonium resistance), under control of the *PgpdA* promoter and *TrpC* terminator from *Aspergillus nidulans* (Punt *et al.*, 1991) inserted into the PstI site of the constructs. Transformations were performed by the protoplast/PEG/CaCl₂ method as previously described (Bogo *et al.*, 1998).

For each construction, at least two independent transformants were isolated, but only one was tested.

3. Results

In silico analysis was performed in the *M. anisopliae chit1* gene 5' flanking region upstream from the transcription start site (TSS) spanning 765 bp. It revealed two CREA motifs (5'GTGGAG3', -550 and 5'CCCCAC3' , -700), a TATA box (nt position -110), two GATA motifs (5'TATC3', -329 and 5'GATA 3', +108), a CT box (nt position +32). Moreover, comparative analysis of the *M.*

anisopliae 5' flanking region with that of *T. reesei* chitinase genes (Seidl *et al.*, 2005) identified putative sites for others types of the transcription factors, namely PacC (5'GCCARG3') and STRE elements (5'AGGGG3'). Figure 1A depicts the putative elements identified using both strategies.

To analyze the functionality of some of the putative elements, constructs with the whole 5' flanking region (*Pchit1-765*, positive control) and deletions were fused to the sGFP reporter sequence. Figure 1B depicts the four constructs with the *M. anisopliae chit1* gene 5' flanking region. *Pchit1-372* lacks the putative elements CREA_1 and CREA_2, *Pchit1-189* lacks the putative elements CREA_1, CREA_2, PacC and GATA_1 and *Pchit1-765Δ198* lacks TATA box, STRE, CT box and GATA_2. The introduction of the constructs in the transformants was confirmed out using primers that amplify the *chit1* gene 5' flanking region of each construct generating amplicons of waited sizes (Figure 2A, 2B). The constructs were transformed to *M. anisopliae* cells, and transformants were selected by their resistance to ammonium glufosinate and verified by PCR using the appropriated primers (see MM 2.5).

The confirmation of the presence of the reporter gene *sgfp* in the transformants was made by PCR. To determine the copy number of the integrated constructs Southern blotting was performed with a 750 bp DNA fragment from the *sgfp* sequence as a probe. Figure 3 shows the results of the hybridization indicating that only one copy of the constructs was integrated in the transformants. For each construction, at least two independent transformants were isolated and one of them was used in the further experiments.

As the accumulation of sGFP in conidia and mycelium was not detected by fluorescence microscopy even in the control construct (data not shown), which spans the complete sequence of the *chit1* gene 5' flanking region herein analyzed, we determined the expression of the reporter sequence by RT-PCR and sGFP immune-detection.

For the transcription profile detection, primers that allow amplification of a 750 bp amplicon derived from the *sgfp* sequence were used. The constitutively expressed *β-tub* gene (β tubulin) gene was used for RNA loading control , generating a 471 bp amplicon. Two culture conditions were evaluated for the induction or repression of the *chit1* gene constructs. The transformants bearing

the constructs were cultured in the presence of colloidal chitin and glucose. To ensure the effects of catabolic repression in the glucose-added cultures, the sugar was supplemented and the sugar content was monitored every 24 h.

Figure 4A shows that the induction of sGFP transcription by colloidal chitin was not of the same magnitude in constructs spanning the 765 bp flanking region and the constructs bearing deletions. The order of levels of sGFP transcription was higher for construct *Pchit1-372*, followed by *Pchit1-765* and *Pchit1-765Δ198*. *Pchit1-189* no transcripts were detected. When in the presence of glucose in the culture medium (Figure 4B) an inversion occurred in the levels of transcripts and construct *Pchit1-765* was more expressed than construct *Pchit1-372*. Both *Pchit1-705Δ129* and *Pchit1-189* did not expressed detectable levels of sGFP transcripts in the presence of glucose.

The sGFP protein expression, detected as a 27 kDa band reactive with anti-sGFP antibodies, the higher transcription levels did not resulted in corresponding protein expression. In the presence of chitin the expression of sGFP was higher in construct *Pchit1-765* than in construct *Pchit1-372*. Constructs *Pchit1-765Δ198* and *Pchit1-189* did not produce detectable sGFP protein. When cultured in the presence of glucose construct *Pchit1-765* produced more sGFP than construct *Pchit1-372*. Constructs *Pchit1-765Δ198* and *Pchit1-189* did not produce detectable levels of sGFP.

To further confirm the patterns of transcription and translation found in the constructs under different culture conditions, the experiment was repeated for each construct in both substrates. Construct *Pchit1-189* was not included since this construct produced no sGFP transcripts in the conditions assayed. Figure 5 shows the results of the comparison for each construct in both colloidal chitin and glucose cultures. Here the differences observed in transcription that were not reflected in translation were more clearly demonstrated. For the control construct *Pchit1-765* the increased transcription in the presence of glucose was reflected in sGFP protein levels. For construct *Pchit1-372* the higher levels of transcripts in the presence of glucose were not observed at protein level. Interestingly, for construct *Pchit1-765Δ198* idespite of the presence of transcripts, sGFP protein was not detected.

4. Discussion

Despite of the numerous genes characterized in *M. anisopliae* the knowledge about the elements controlling expression is still shallow. It is generally accepted the idea that favors the synergistic participation of some hydrolases in the host penetration step during entomopathogenic fungi infection. Studies on isolated enzymes and microarray data support that the genes that code for some of these hydrolases are tightly regulated (Dutra *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). In particular, the chitinases are expected to have a complex regulation, since they are involved in many different aspects of the fungal biology, as growth and nutrient acquisition/pathogenicity. Indeed, studies on the regulation of the expression of chitinases in other fungi have emphasized this complexity (Viterbo *et al.*, 2002; Seidl *et al.*, 2005).

Our results add some information about such a regulation on the *chit1* chitinase gene in *M. anisopliae*. As a first step we performed *in silico* analysis to identify potential controlling elements in the 5' flanking region of the gene. The application of some available algorithms and direct comparison with described regulatory sequences in other fungi allowed the identification of some putative controlling elements. After the construction of the deletion cassettes with the *chit1* gene 5' flanking region our main strategy was to use the sGFP reporter protein to easily detect the functional sequences. However, the expression level even with the full 765 bp flanking region was very weak and undetectable by fluorescence microscopy or fluorometry. Therefore, we used RT-PCR and Western blot to detect transcripts and protein of the reporter sGFP.

Construct *Pchit1-765* which spans all the identified putative elements (CREA, GATA, STRE and PacC) expressed transcripts and sGFP protein in both culture with both substrates, colloidal chitin and glucose. However, the transcript level of this construct was lower than from construct *Pchit1-372*, which lacks two binding sites for CREA element. This suggests that within 372 bp deleted in construct *Pchit1-372* may contain an element that responds to the presence of chitin, causing repression of transcription in construct *Pchit1-765*.

This implies that in construct *Pchit1-765*, other proteins, besides CREA, could bind to *chit1* gene sequences and repress its expression when cultured in presence of colloidal chitin. Conversely, when cultured in glucose would not

bind and no repression would be detected. In construct Pchit1-372 such motive was deleted and therefore these negative regulator proteins would not bind to the *chit1* gene sequences and the repression would not occur, leading to the expression of the gene independently of the presence of chitin or glucose. Alternatively, a yet unidentified motive (5'GGAATGGATGAGTGGAATGTTCCCACCACTCTCTAACCTG3', -271), could be site for protein binding induced basal transcription by chitin. This element has high similarity with the sequence identified by Herbert *et al.* (2002), which required for the transcriptional activation of *CLPG2* gene, which codes an endopolygalacturonase of the bean pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*, in presence of pectin and during appressorium development.

On the other hand, in presence of glucose, the reporter transcription level, both constructs, Pchit1-756 and Pchit1-372, were similar suggesting that the putative CREA elements (1 and 2) are not functional in these case.

Many genes are repressed by the presence of easily metabolizable carbon sources, such as glucose, and induced by the presence of the substrate polymers. Sites for carbon catabolic repressor CREA and binding sites for transcriptional activators or factors modulating expression have been found in the promoter of genes encoding plant cell wall degrading enzymes (Aro *et al.*, 2005). In the filamentous fungi *A. nidulans* repression of gene transcription by glucose is regulated by the carbon catabolic repressors Crea and in *Trichoderma reesei*, is regulated by CRE1 (Jekosch and Kuck, 2000). CREA motifs were also found in the 5' flanking region of the *M. anisopliae chit1* gene, however they were not functional in our experiments.

Construct Pchit1-189, where putative CREA, PacC and GATA_1 motifs were deleted, rendered no detectable reporter transcripts pointing for the importance of this deletion region for the expression of the *chit1* gene. This construction is the only to lack the 27 bp element identified in *Colletotrichum lindemuthianum* (Herbert *et al.*, 2002), and so this element apparently does not contribute to the basal expression suggested above.

Construct Pchit1-765 Δ 198 which lacks the putative TATA box, STRE, CT box and GATA_2 elements produced sGFP transcripts in presence of both glucose and colloidal chitin. This construction displayed basal levels of transcription as Pchit1-765 and Pchit1-372, but the sequence deleted could

include an element that would increase transcription. However, no sGFP protein was detected implying that either truncated transcripts are produced or that sequences important for ribosomal binding and translation are located in a deleted region of the *chit1* gene. The apparent lack of functionality of the putative TATA box is not surprising since a variety of fungal TATA-less genes are described (Staats *et al.*, 2004).

Our data indicate that *chit1* expression is regulated in a complex way. It was demonstrated that the *chit1* expression is regulated differently from chitinase genes from other fungi since it is not controlled for carbon repression. Two signals appear to influence its expression: it is highly expressed in glucose presence and induced by colloidal chitin. The binding sites for transcription factor CREA found in the 5' flanking region do not seem to be functional *in vivo*. A more detailed group of deletion mutants will be necessary to further characterize the promoter region of the *chi1* gene.

5. Reference List

- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTIÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 719-739, 2005.
- BARATTO, C.; DUTRA, V.; BOLDO, J.; LEIRIA, L.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Isolation, characterization and transcriptional analysis of the chitinase *chi2* gene from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Current Microbiology**, v. 53, p. 217-221, 2006.
- BARRETO, C.C.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of *N*-acetylglucosamine in protein secretion. **Current Microbiology**, v. 48, p. 102-107, 2004.
- BOGO, M. R.; ROTA, C.A.; PINTO JR., H.; OCAMPOS, M.; CORREA, C. T.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: Isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. **Current Microbiology**, v. 37, p. 221-225, 1998.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; BROETTO, L.; SCHRANK, I.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 245-251, 2004.
- FANG, W.; LENG, B.; XIAO, Y.; JIN, K.; MA, J.; FAN, Y.; FENG, J.; YANG, X.; ZHANG, Y.; PEI, Y. Cloning of *Beauveria bassiana* Chitinase gene *Bbchit1* and Its Application To Improve Fungal Strain Virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 363-370, 2005.
- FANG, W. AND M. J. BIDOCHKA. Expression of genes involved in germination, conidiogenesis and pathogenesis in *Metarhizium anisopliae* using quantitative real-time RT-PCR. **Mycology Research**, v. 110, p. 1165-1171, 2006.
- FAN, Y.; FANG, W.; GUO, S.; PEI, X.; ZHANG, Y.; XIAO, Y.; LI, D.; JIN, K.; BIDOCHKA, M. J.; PEI, Y. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* overexpressing an engineered chitinase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 295-302, 2007.
- FERNÁNDEZ-ÁBALOS, J. M.; FOX, H.; PITT, C.; WELLS, B.; DOONAN, J. H. Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, v. 27, p. 121-130, 1998.

- HARLOW AND LANE **Antibodies: A Laboratory Manual** Cold Spring Harbor Press, 1988.
- HERBERT, C.; JACQUET, C.; BOREL, C.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T.; DUMAS, B. A *cis*-acting sequence homologous to the yeast filamentation and invasion response element regulates expression of a pectinase gene from the bean pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 32, p. 29125-29131, 2002.
- JEKOSCH, K. AND U. KUCK. Glucose dependent transcriptional expression of the *cre1* gene in *Acremonium chrysogenum* strains showing different levels of cephalosporin C production. **Current Genetics**, v. 37, p. 388-395, 2000.
- LAEMMLI UK Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- MORAES, C. K.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. **Current Microbiol.**, v. 46, p. 205–210, 2002.
- PINTO, A. S.; BARRETO, C. C.; SCHRANK, A.; ULHOA, J.; VAINSTEIN, M. H. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal Microbiol.**, v. 43, p. 322-327, 1997.
- PUNT, P.J.; GREAVES, P.A.; KUYVENHOVEN, A.; VAN DEUTEKOM, J. C.; KINGHORN, J. R.; POWELS, P. H.; VAN DEN HONDEL, C. A. A twin-reporter vector for simultaneous analysis of expression signals of divergently transcribed, contiguous genes in filamentous fungi. **Gene**, v. 104, p. 119-122, 1991.
- SAMBROOK, J. AND RUSSEL, D. **Molecular Cloning: a Laboratory manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.
- SCREEN, S. E.; HU, G.; ST. LEGER, R. J. Transformants of *Metarhizium anisopliae* *sf. anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* *sf. acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 260-266, 2001.
- SEIDL, V.; HUEMER, B.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C. P. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. **The FEBS Journal**, v. 272, p. 5923-5939, 2005.
- SILVA, M. V.; SANTI, L.; STAATS, C. C.; COSTA, S. M.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 382-392, 2005.

VITERBO, A.; MONTERO, M.; RAMOT, O.; FRIESEN, D.; MONTE, E.; LLOBELL, A.; CHET, I. Expression regulation of the endochitinase *chit36* from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). **Current Genetics**, v. 42, p. 114-122, 2002.

WANG, C.; HU, G.; ST. LEGER, R. J.. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 704-718, 2005.

6. Figure legends

Figure 1: The *chi1* gene 5' flanking region map and constructs. Panel A: Nucleotide sequence of the 5' upstream region of the *M. anisopliae chi1* gene. Putative transcription controlling elements with their consensus sequences and TATA (-110) and CT boxes (+32) within the 5'-untranslated region are underlined and indicated by numbered colorful circles. The transcription start site (TSS) is indicated by + 1. Panel B: Schematic representation of the deletion constructs *Pchit1* -765, *Pchit1*-372, *Pchit1*-189, *Pchit1*-765 Δ 198 and regulatory elements.

Figure 2: Constructs confirmation and transformants. Panel A- Confirmation of the constructs including a *sgfp* ORF: (765) *pPchit1*-765 that generates an amplicon of 1,542 pb; (372) *pPchit1*-372 that generates an amplicon of 1,149 pb; (189) *pPchit1*-189 that generates an amplicon of 966 pb; (Δ) *pPchit1*-765 Δ 198 that generates an amplicon of 1,344 pb. Panel B - Analysis of the presence of the reporter gene *sgfp* in the transformants: (+) GFP+; (-) negative control with no template; (765) *Pchit1*-765; (373) *Pchit1*-372; (189) *Pchit1*-189; (Δ) *Pchit1*-765 Δ 198 constructs.

Figure 3: Southern blot analysis of transformants of *M. anisopliae* DNA hybridized with labeled 750 bp sGFP amplicon. Genomic DNA was digested with EcoRV, Lanes: (1) *Pchit1*-765; (3) *Pchit1*-372; (5) *Pchit1*-189; (7) *Pchit1*-765 Δ 198, and digested with XbaI, lanes: (2) *Pchit1*-765, (4) *Pchit1*-372, (6) *Pchit1*-189, (8) *Pchit1*-765 Δ 198.

Figure 4: Analysis of GFP expression by RT-PCR and Western blot. Panel A: Transformants of *M. anisopliae* cultivated in colloidal chitin 0.4%. Panel B: Transformants of *M. anisopliae* cultivated in glucose 1%. (-) negative control with no template; (+) Genomic DNA GFP+; (E6) Wt E6; (GFP+) GFP+; (765) *Pchit1-765*; (372) *Pchit1-372*; (189) *Pchit1-189*; (Δ) *Pchit1-765* Δ 198 constructs.

Figure 5: Comparison of the pattern of transcription and translation of the transformants in 0.4% (mRNA) or 0.8% (protein) colloidal chitin and 1% glucose. (GFP+) GFP+; (E6) Wt E6; *Pchit1-765*; *Pchit1-372*; *Pchit1-189*; *Pchit1-765* Δ 198 constructs.

7. Figures

A

Pchit1 765 >
 GCATGCGCAGGCTTCAGACTTCATGTGGGCTTTGTAGTTTCTGCACAGCTTCACAACCCGCCCTCTGGAA -705
 CCTCCCCACCATCTTTTACCGTCTCATGTGAGGTTTTTGCACACATGCATGGAGCACGGAACCTGGTTA -635
 TGGGGTGTAGTACGTACTTTTGACATCTTGTCACTTCTGTCCATTGCTCATGCGTCGCTCTGTTCATCG -565
 CCAAACGTGCCAAGGTGGAGCGCTTGTGCGATGCTCCCAGTTGCAAATGGCCGCACGGAAATGAGAGAA -495
 GCATCCTTTTATGGACTGCACCAACTACTCAGTAGCCACGAATAGGCTATGTGTGGTCAATTAGTGAGT -425
 CGGTATTTTCAATTGAGCGCATCAGCAACGTTGCCGAGCCGAACGATGAGTACTGTCTCAGCCAGGGC -355
 GAGCCTACCAGCCAGGTATGCCTCCTATCCAGTCGAGACTATCACGAGATCAGCATTGCCGAGTAACCA -285
 GTGGTATGCTAAGGAATGGATGAGTGGAAATGTTCCCACCCTCTCTAACCTGCCTAATGGTCTTCCATGC -215
 TAGATGAGACGGCAAGCCTTTCTTCGCCTCAACCATGCTACCCATGTTGACAATTTCTTATCAACTACC -145
 GAATACCTGCGAAGTCAACGTCGTCGTGGTCTTGTATAAAATAGGGGCCACATTCCTTCGAGGTAGTTCAC -75
 +1
 GGAAGACACGCTACCACTACATCACTCCCTACATATCCCCCCTTTTCTACCCGGCCCTGGTGGCTCTT +65
 TCATCAATTGACAAGCACTTCTATTCAAATTACAGTACAGAGATAACTCGGGTCAACGATatgocgtcg +135
M P S

Sequence	Position	Putative function
A	+1	TSS
① GTGGAG	-700	CREA_1
② CCCCAC	-550	CREA_2
③ GCCAGG	-344	PacC
④ TATC	-329	GATA_1
⑤ TATAAATA	-110	TATA box
⑥ AGGGG	-103	STRE
⑦ C(7)T(5)	+32	CT box
⑧ GATA	+108	GATA_2

Figure 1A

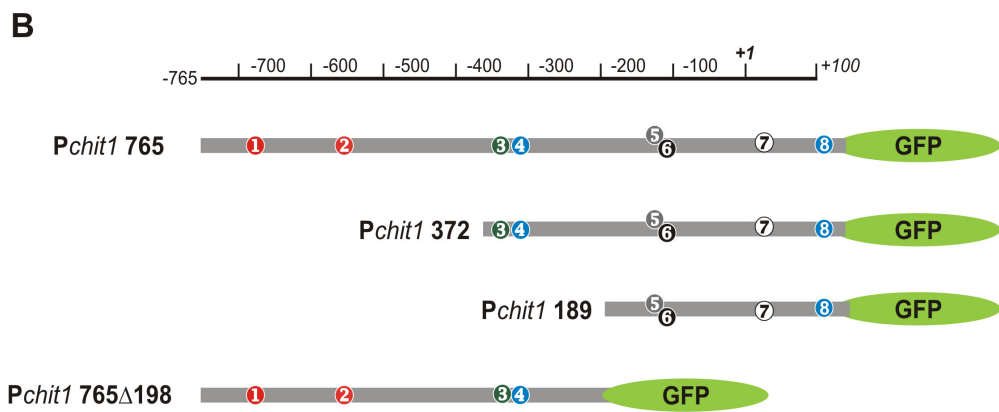


Figure 1B

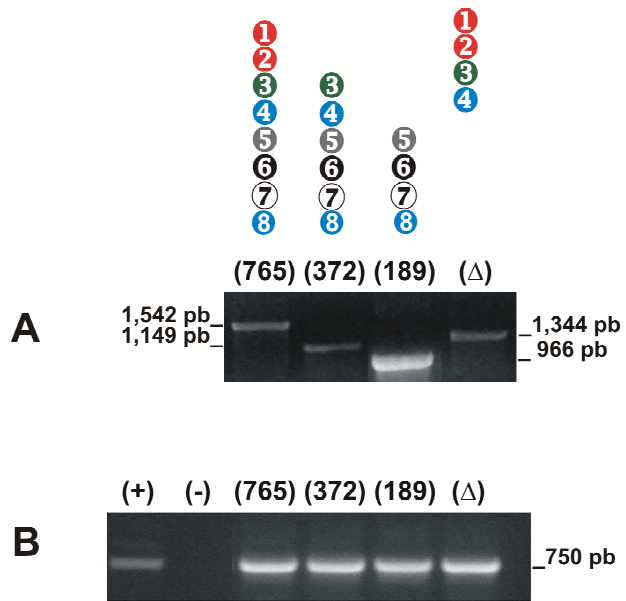


Figure 2

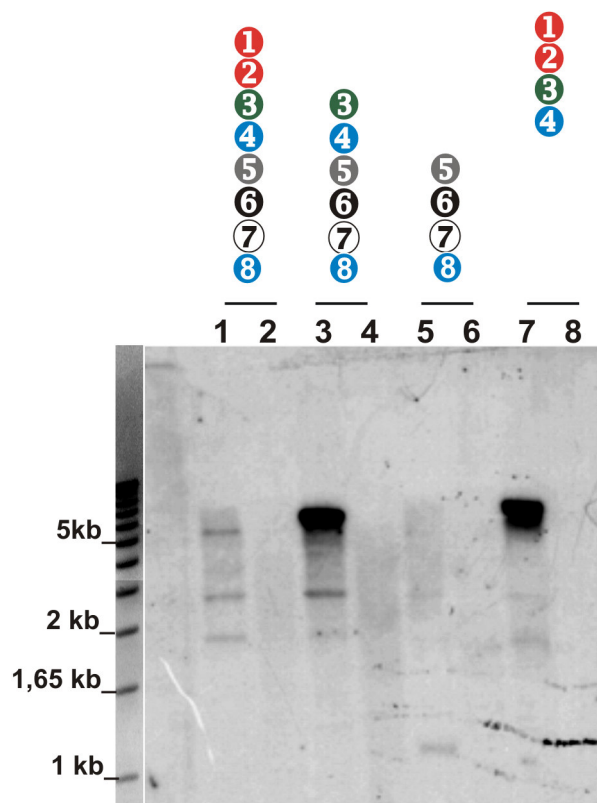


Figure 3

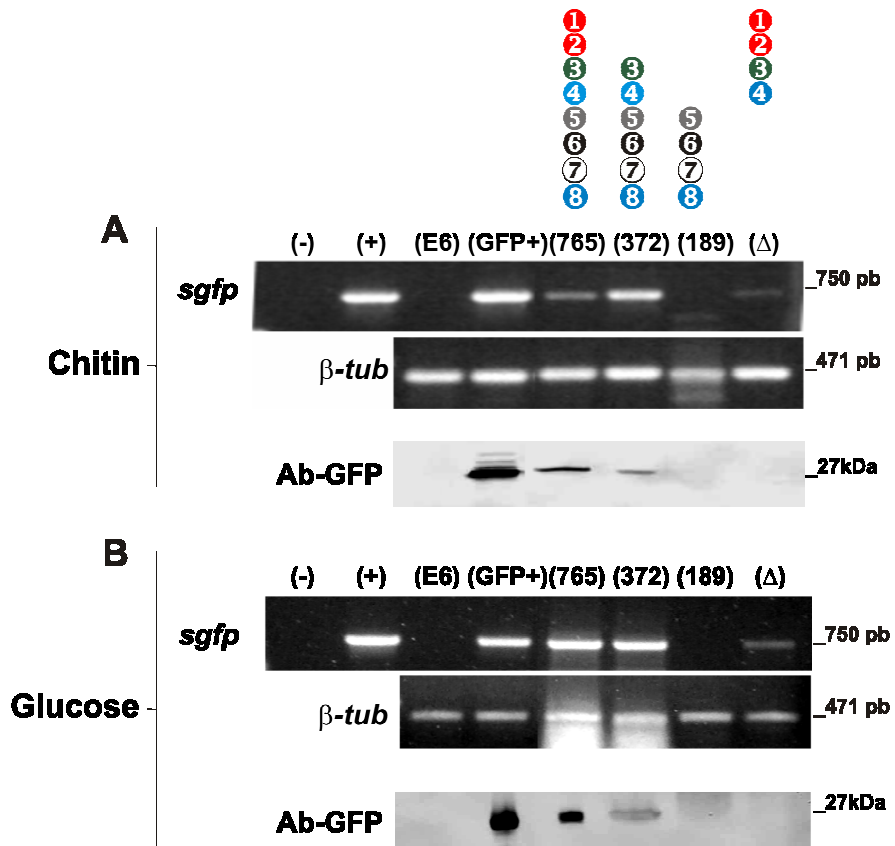


Figure 4

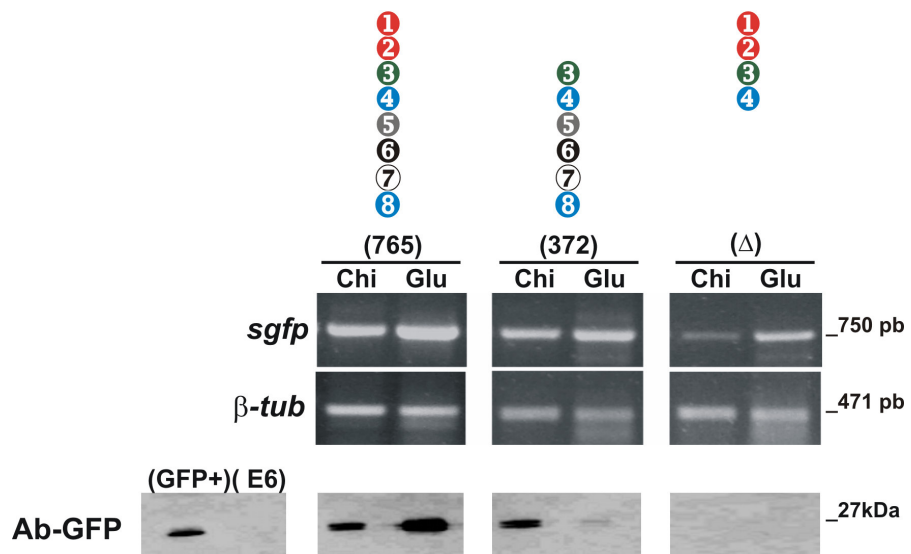


Figure 5

DISCUSSÃO

Embora o fungo *Metarhizium anisopliae* seja o entomopatógeno melhor caracterizado, ainda é limitado o conhecimento dos mecanismos envolvidos no processo de infecção de hospedeiros susceptíveis. Abordagens específicas, como por exemplo, o isolamento e caracterização de uma determinada hidrolase (Silva *et al.*, 2004) e abordagens mais amplas, como por exemplo, a seleção de seqüências diferencialmente expressas em condições de infecção (Dutra *et al.*, 2004), permitiram a caracterização de vários genes em *M. anisopliae*. Entretanto pouco se conhece dos mecanismos de controle da expressão destes genes isolados. Em especial, o sistema de degradação de quitina neste fungo tem se mostrado complexo. A degradação deste polímero ocorre em duas situações: na alteração da morfologia celular durante o desenvolvimento e diferenciação e na utilização dos monômeros para nutrição.

Neste trabalho, caracterizamos parcialmente a região flanqueadora 5' do gene *chit1* de *M. anisopliae*, com o objetivo de auxiliar na elucidação do controle da expressão deste gene.

Bogo *et al* (1998) isolaram e caracterizaram a seqüência codificadora do gene *chit1* de *M. anisopliae* e uma porção da região promotora identificando alguns elementos presentes na região flanqueadora 5' não-traduzida deste gene. Com o intuito de identificar novas seqüências de ligação para fatores de transcrição já descritos e analisar quais destes elementos podem influenciar na transcrição da quitinase CHIT42, deleções geradas por PCR foram produzidas na região flanqueadora 5' do gene *chit1*. Quatro deleções geradas foram fusionadas com a ORF do gene repórter *sgfp* e o terminador do gene *trpC* de *A nidulans* e transformadas em *M. anisopliae*. Diversos transformantes, contendo uma das quatro deleções, foram selecionados e somente um representante de cada construção foi analisado. O objetivo era verificar a funcionalidade de cada região deletada usando o fenótipo de produção de sGFP. As construções das deleções foram realizadas por Baratto (2001) em nosso laboratório.

A exatidão de cada uma das construções foi verificada por metodologias de PCR, *Southern blot* e seqüenciamento. Existe a possibilidade de que as construções tenham se integrado em diferentes lugares no genoma e

que possam estar sofrendo influências diferentes dependendo do sítio de integração, uma vez que este não foi determinado e, portanto, as regiões que flanqueiam cada construção no genoma de *M. anisopliae* podem potencialmente interferir nas construções repórter. Após a confirmação da presença do gene repórter e das diferentes construções, foram feitas análises de microcultivos por microscopia ótica usando fluorescência no comprimento de onda de emissão da proteína sGFP. Provavelmente devido ao baixíssimo nível de expressão das seqüências reguladoras do gene *chit1*, não foi possível detectar fluorescência de sGFP na construção controle que possuía os 765 pb da região flanqueadora 5'. Todos experimentos sempre foram acompanhados de um controle que consistia de um transformante de *M. anisopliae* que superexpressa sGFP a partir do promotor constitutivo *Pgpd* de *Aspergillus nidulans* (Charley Staats, 2005, comunicação pessoal). Para tentar aumentar o nível de sensibilidade da detecção de fluorescência, emitida por sGFP, foi procedida a análise das construções por espectrofluorimetria (Fernandez-Abalos *et al.*, 1998). Entretanto esta metodologia também se mostrou incapaz de detectar a expressão de sGFP neste sistema.

O fato da expressão dirigida pelo *Pchit1* ser tão baixa que impediu a detecção da atividade de sGFP, nos fez optar por métodos de detecção de mRNA e proteína (anti-soro) que finalmente produziram resultados na detecção da expressão das construções com sGFP.

A análise *in silico* da região promotora do gene de quitinase *chit1* identificou diversos motivos de ligação para fatores de transcrição já descritos. Foram encontrados dois motivos de ligação para a proteína CCR1, identificada por Screen *et al.* (1997), homóloga às proteínas CREA em *Aspergillus nidulans* e CRE1 em *T. reesei* (Jekoschand e Kuck, 2000), localizados na posição -550 no sentido direto e -700 no sentido inverso. Estes sítios de ligação foram mantidos somente na construção *Pchit1-765* e *Pchit1-765Δ198*.

Diferentemente do que foi observado por Bogo *et al.*, (1998), esperava-se que o gene *chit1* tivesse um controle baseado em repressão catabólica, onde em presença de glicose 1% ocorreria a repressão deste gene.

Muitos genes de microorganismos são reprimidos em presença de fontes de carbono facilmente metabolizadas, tais como glicose, e são induzidos em presença de polímeros (Yamazaki *et al.*, 2007).

A cutícula dos insetos é composta por proteínas, lipídeos, ácidos graxos e esteróides, formando uma barreira contra o ataque e a penetração de microorganismos (Pinto *et al.*, 1997). A parede celular de plantas também constitui-se em uma barreira contra o ataque de fungos fitopatogênicos. Para que ocorra a degradação desta parede, é necessário a síntese de enzimas codificadas por genes que possuem sítios de ligação para repressores de carbono e sítios para ativadores ou moduladores da expressão.(Aro *et al.* 2005).

O transformante que manteve a região promotora íntegra (*Pchit1-765*), contendo os prováveis elementos reguladores, CREA 1 e 2, GATA_1 e GATA_2, STRE, PacC, apresentou expressão nas duas condições de cultivo testadas (glicose 1% e quitina coloidal 0,4%). Comparado com a construção *Pchit1-372*, que não apresenta os dois sítios de ligação para proteína CREA, o nível de transcrito da construção *Pchit1-765* foi mais baixo em presença de quitina, indicando que dentre os 393 pb que foram excluídos nesta construção possa existir um elemento que responde reprimindo a transcrição do gene em presença deste substrato. O mesmo não foi observado em presença de glicose, pois o nível de transcrição parece o mesmo para ambas as construções, sugerindo que a possível presença de um elemento repressor nos 393 pb examinados, não afeta a expressão em presença de glicose.

Os dados apresentados neste trabalho sugerem que o gene *chit1* possa não sofrer repressão em presença de glicose, uma vez que, quando o transformante *Pchit1-765* foi cultivado em glicose, não ocorreu repressão do gene repórter. Outra explicação seria que o gene repórter está sofrendo regulação de um gene induzido por glicose ou de um outro elemento presente na região adjacente ao sítio de inserção.

A região promotora do gene *chit1* contém duas cópias do sítio de ligação consenso para proteína CREA, assim como ocorre em promotores de outros fungos, onde estes sítios são organizados como repetições diretas ou inversas, mostrando-se funcionais *in vivo* (Cubero *et al.*, 1994). Diferentemente do que ocorre com o promotor do gene *chi33* de *T. harzianum* (Dana *et al.* 2001) e *ech42* de *T. atroviride* (Mach *et al.*, 1999) que contém somente um sítio de ligação consenso para proteína CREA.

A análise *in silico* da região 5' flanqueadora do gene *chit1* de *M. anisopliae* sugeriu um sítio de ligação para o fator STRE envolvido na resposta às condições de estresse. Este sítio foi localizado na posição -103 pb em relação ao sítio de início de transcrição e está presente nas construções *Pchit1-765*, *Pchit1-372* e *Pchit1-189*.

Na seqüência promotora da endoquitinase *Bbchit1* de *B. bassiana* foram encontrados dois para o fator STRE. Este fator tem sido encontrado em promotores de genes que sofrem regulação em situações de estresse osmótico, temperatura, baixo pH (Seidl *et al.*, 2004). Os fatores de transcrição (*seb1*, *MSN2*, *MSN4*), envolvidos na indução de uma ampla gama de condições ambientais e fisiológicas, permitem às células desenvolverem tolerância a diferentes formas de estresse. Estes fatores reconhecem a seqüência consensual 5' AGGGG 3' e já foram observados na região promotora dos genes *ech42*, *chi33* e *nag1* que codificam quitinases em espécies de *Trichoderma*. Kubicek *et al.* (2002) demonstraram que a perda do gene *seb1* de *T. atroviride* não afeta a expressão das quitinases *ech42* ou *nag1*, indicando que a proteína *seb1* liga-se à seqüência consensual, mas não é responsável pela indução destes promotores *in vivo*.

As análises feitas com os cultivos de *M. anisopliae* em glicose 1% e quitina coloidal 0,4% não levaram em consideração qualquer condição de estresse, uma vez que o fungo foi cultivado em condições constantes (temperatura à 28°C, pH, 150 rpm, concentração de sais). Mais experimentos são necessários para avaliar a expressão do gene *chit1* frente a diversas condições de estresse.

Em *Metarhizium anisopliae* a expressão de genes que codificam enzimas secretadas no meio extracelular, importante para o processo de infecção, é regulada pelo pH do ambiente. Algumas enzimas são sintetizadas somente em pH onde sua função é efetiva, independente se no meio de cultivo existe um substrato indutor. A secreção de quitinases ocorre quando o fungo está em contato com pH entre 5 e 8, sofrendo, portanto, influência do pH do ambiente (St. Leger *et al.*, 1998). O fator PacC é responsável pela regulação destes genes que dependem do pH para serem expressos em fungos. O gene *pacC* é expresso mas inativo, quando em ambiente alcalino, este fator se torna

ativo, por proteólise e ativa genes expressos em ambiente alcalino e reprime aqueles que funcionam em ambiente ácido (Denison, 2000).

Baseado no fato de que as quitinases são produzidas em pHs entre 5 e 8 e que um sítio consensual de ligação para o fator PacC foi encontrado na região flanqueadora 5' do gene *chit1*, sugere-se que este gene também possa ser regulado pelo pH do ambiente. Portanto, neste estudo, as análises feitas com os cultivos de *M. anisopliae* em glicose 1%, quitina coloidal 0,4% e quitina coloidal 0,8% foram realizadas em pH 6, não tendo sido sendo testadas outras faixas de pH. Mais experimentos são necessários para analisar a diferença de pH na expressão do gene *chit1*.

Nas construções *Pchit1-765* e *Pchit1-372* da região flanqueadora 5' do gene *chit1* de *M. anisopliae* foram encontrados dois sítios de ligação (5' TATC 3' ou 5' GATA 3') para a proteína AREA localizados a -329 e +108 pb em relação ao sítio de início de transcrição. Já nas construções *Pchit1-189* e *Pchit1-765Δ198* foi mantido somente o sítio de ligação para proteína AREA localizado na posição +108 pb. Foi demonstrado que para o sítio *areA* ser funcional precisam existir duas ou mais repetições diretas ou inversas separadas por alguns pares de bases (Feng *et al.*, 1993). Nas duas condições testadas foi adicionado nitrato de sódio, como fonte de nitrogênio. Portanto, em nenhum momento acrescentou-se este substrato, nem foi medida a quantidade de nitrato que ainda restava no cultivo. Experimentos específicos utilizando substratos adequados para análise da regulação desta quitinase em presença de fontes de nitrogênio devem ser feitos para obter uma comprovação experimental sólida da regulação desta quitinase frente a diferentes fontes de nitrogênio.

A repressão metabólica de nitrogênio em *A. nidulans* é mediada pelo gene *area*. As proteínas reguladoras envolvidas na regulação por nitrogênio são pertencentes dos fatores de transcrição da família GATA, possuem domínio de ligação ao DNA do tipo dedos de zinco e se ligam à seqüências consensual 5' GATA 3'. O fator de transcrição AREA é necessário para a expressão de muitos genes estruturais, como por exemplo, os de permeases, envolvidas no metabolismo de diversas fontes de nitrogênio (Kudla *et al.*, 1990) sendo ativo somente em condições limitantes deste substrato. A expressão destas enzimas catabólicas envolvidas na assimilação de fontes secundárias

de nitrogênio é altamente regulada. Quando fontes primárias de nitrogênio, como amônia, glutamina e glutamato, não estão disponíveis ou estão presentes em concentrações baixas o suficiente para limitar o crescimento, outras fontes de nitrogênio são utilizadas, como nitrato, nitrito, purinas, aminoácidos e proteínas (Marzluf, 1997). O fator CREA é modulado por diferentes mecanismos, como por exemplo, pela proteína TAM que interage com AREA e influencia os níveis de transcrição de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio (Small *et al.*, 2001).

A análise feita por RT-PCR demonstrou que a deleção de 393 pb da construção *Pchit1-372* não aboliu a transcrição, sugerindo que a região deletada não é essencial para a transcrição do gene *chit1* tanto em presença de quitina coloidal quanto em presença de glicose. A construção *Pchit1-372* não apresenta os dois sítios de ligação para a proteína CREA e como esperado, em presença de glicose não ocorreu a repressão da transcrição da sGFP.

A construção onde 576 pb foram deletados (*Pchit1-189*), sem os sítios de ligação para os fatores CREA e GATA_1, não apresentou expressão de transcrito nem de proteína sGFP. Este resultado sugere que nesta região possa existir algum elemento responsável pela expressão do gene *chit1*. Outra explicação plausível seria uma deficiência do sistema de transformação por possíveis problemas desta construção. A análise morfológica da colônia desta construção foi a única a apresentar diferença em relação às outras construções e a linhagem selvagem. A linhagem contendo esta construção, quando repicada em estrias, gerava colônias únicas, indicando que o cassete contendo esta construção pode ter se inserido em uma região importante para o desenvolvimento do fungo.

A construção onde a região flanqueadora 5' do gene *chit1* foi mantida (*Pchit1-765Δ198*) e 198 pb foram deletados até o sítio de início de transcrição, apresentou um nível mais baixo de transcritos comparada com os outros transformantes. Essa construção não apresenta as seqüências consensuais para os fatores STRE e GATA_2 e não possui o provável elemento *TATA box* e nem *CT box*. A expressão a partir desta construção ocorreu tanto em presença de glicose quanto em presença de quitina coloidal, sugerindo que uma porção

de 567 pb a montante do início de transcrição contém seqüências reconhecidas por fatores que induzem a expressão desta quitinase.

O provável elemento TATA encontrado na região 5' do gene *chit1* não parece ser funcional *in vivo*, uma vez que, mesmo este elemento tendo sido deletado, ainda ocorreu a expressão deste gene. O elemento TATA é reconhecido como um elemento crítico para o início da transcrição da RNA polimerase II (Buratowski, 1994). Muitos genes de quitinases estudados em fungos filamentosos, que tiveram a região promotora mapeada, possuem um sítio putativo para o elemento TATA box porém não foram comprovados como funcionais *in vivo* (Dana *et al.*, 2001; Viterbo *et al.*, 2002; Ike *et al.*, 2006;) ou não apresentam a seqüência TATA (Staats *et al.*, 2004). Os promotores que não possuem a seqüência TATA são comumente chamados de TATA-less. Nesses promotores ocorre uma via alternativa para formação do complexo de pré-iniciação, onde proteínas associadas à proteína TBP (TAFs) contribuem para o recrutamento na região promotora interagindo tanto diretamente quanto indiretamente através de proteínas que se ligam ao iniciador ou à RNA polimerase II (Martinez *et al.*, 1994).

A análise da expressão de sGFP das construções demonstrou que os transformantes *Pchit1-765* e *Pchit1-372* expressaram uma proteína de 27 kDa correspondente ao tamanho da proteína sGFP (Lopes *et al.*, 2004) e que é reconhecida por anti-soro anti-GFP. Isto sugere que as construções são viáveis e geraram proteínas, hipoteticamente, funcionais. Os dados obtidos com a comparação da expressão de sGFP do transformante *Pchit1-372* em presença de glicose e de quitina coloidal não corroboram com os dados obtidos na análise de transcritos, pois a quantidade de proteína total transferida no cultivo feito em glicose foi menor que no cultivo em presença de quitina, por isso, a expressão em presença de quitina parece ser maior. A proteína de 27kDa não foi detectada na construção *Pchit1-765Δ198*, embora o transcrito tenha sido detectado, sugerindo que possa estar sendo sintetizada uma proteína truncada ou mais susceptível a degradação. As regiões flanqueadoras 5' de mRNAs eucarióticos têm um papel fundamental na regulação pós-transcricional, determinando, desse modo, a taxa de síntese da proteína (Dana e Pintor-Toro, 2005). É possível, portanto que a deleção *Pchit1-765Δ198* tenha retirado da construção alguma seqüência importante para a tradução.

Alguns estudos relatam a existência de pequenas ORF (uORFs), geradas em aproximadamente 10% dos transcritos, que contribuem para inibir ou reduzir níveis basais de proteínas em muitos fungos e leveduras (Dana e Pintor-Toro, 2005). Estas uORFs podem modular a habilidade do ribossomo de reiniciar a tradução, reduzindo ou aumentando a eficiência de tradução sem afetar o nível de mRNA (Morris *et al.*, 2000). A região flanqueadora 5' do gene *chit1* suprimida na construção *Pchit1-765Δ198* poderia conter uORFs que afetariam o nível de tradução, justificando, assim, a presença de transcrito e ausência de proteína.

Na maioria dos mRNA, a porção 5' possui uma estrutura chamada CAP. Esta estrutura é importante no recrutamento da maquinaria de tradução. Mas, em alguns genes esta estrutura não está presente, como no caso de alguns vírus, ou não está acessível para a ligação de alguns fatores de tradução importantes para ligação do ribossomo. Nestas situações, o aparato de tradução reconhece sítios internos de ligação do ribossomo (IRES) independente de CAP. Existem situações que favorecem a tradução independente de CAP, como por exemplo durante a mitose, apoptose, condições de estresse e de crescimento. A região deletada no transformante *Pchit1-765Δ198* poderia conter um sítio interno de ligação para o ribossomo, que quando deletado não permitiria que o mRNA fosse traduzido.

A expressão de sGFP, tanto a nível de proteína quanto de transcrito, em cultivos com duas fontes de carbono distintas, glicose 1% ou quitina coloidal 0,4%, demonstrou que o gene *chit1* pode ser expresso tanto em presença de quitina quanto em presença de glicose, sendo, porém mais elevado o nível de expressão sGFP em cultivos na presença de glicose. Estes dados sugerem que o gene *chit1* possa ser induzido em presença desta fonte de carbono.

Uma ampla gama de quitinases são induzidas por quitina cristalina e quitina coloidal em *Aspergillus fumigatus* (Yamazaki *et al.*, 2006) e *B. bassiana* (Fang *et al.*, 2005) e reprimidas por glicose. Existem também quitinases, como a endoquitinase CHIT36 de *Trichoderma harzianum* que é induzida em condições de estresse, pelo monômero N-acetilglicosamina e também por quitina coloidal. A quitinase *ech42* de *T. atroviride* é induzida por depleção de fontes de carbono e condições de estresse (Viterbo *et al.*, 2002).

Moraes *et al.* (2002) analisaram a secreção de quitinases de *M. anisopliae* em culturas contendo diferentes fontes de carbono, demonstrando que em presença de GlcNac e em cutícula de carrapato acrescido de GlcNac, foram detectados altos níveis da atividade desta enzima. A secreção de quitinase diminuiu gradativamente com o aumento da concentração de GlcNac, sugerindo uma regulação dupla, pois em baixas concentrações deste monômero, altos níveis de secreção foram detectados, e em altas concentrações ocorreu uma diminuição desta produção.

Bogo *et al.* (1998) verificaram que a expressão do gene *chit1* em *M. anisopliae* era reprimida em presença de glicose 1% ou GlcNac 1%, mas que em presença de quitina 0,8% ocorria a indução desta quitinase. Também foi mostrado que *M. anisopliae* secreta quitinases extracelulares quando cultivado em meios contendo quitina, indicando, assim, que a síntese destas enzimas é induzida por este substrato. (Barreto *et al.*, 2004).

Neste estudo, todos os cultivos com glicose 1% receberam reposição de glicose a cada 24 h para assegurar que o sistema manter-se-ia reprimido, uma vez que, segundo Bogo *et al.* (1998), Moraes *et al.* (2002), Barreto *et al.* (2004), Fang *et al.* (2005) e Yamazaki *et al.* (2007) a glicose reprime genes de quitinases.

Com os dados apresentados neste trabalho, sugere-se que a expressão do gene *chit1* não sofre indução por depleção de fontes de carbono, uma vez que a concentração de glicose foi mantida durante o cultivo. Yamazaky *et al.* (2007) verificaram que a quitinase CHIB de *A. nidulans* é responsável pela maior atividade quitinolítica durante o processo de autólise e é fortemente induzida por depleção de fontes de carbono. Portanto, o gene *chit1* não parece participar do processo de autólise em *M. anisopliae*.

Uma das funções das quitinases está relacionada com as vias de modificação da parede celular do fungo, necessária para germinação do conídios e na diferenciação celular. A quitina confere a parede celular grande rigidez e sua degradação é necessária para a formação do tubo germinativo. Takaya *et al.* (1998) sugeriram que a quitinase CHIA de *A. nidulans* hidroliza a parede celular antes da formação do tubo germinativo. Entretanto a perda desta atividade não interrompeu a germinação, sugerindo que sua função pode ser substituída por outras quitinases. Por outro lado, o nocaute do gene que

codifica a quitinase CHITB1 de *A. fumigatus* não alterou o crescimento e nem a morfologia dos mutantes em relação à linhagem selvagem (Jaques *et al.*, 2003).

O gene *chit1* de *M. anisopliae* pode estar envolvido nos processos de diferenciação celular, tais como alteração da parede necessária durante o crescimento micelial. Isto é explicado pelo fato de que em presença de glicose esta quitinase não é reprimida, pois em presença deste substrato, ocorre um crescimento maior e, portanto, é necessária a presença de enzimas responsáveis pela degradação da parede celular para que o fungo possa estender suas hifas e ramificar-se. Além disso, o gene *chit1* pode estar envolvido na diferenciação do apressório, ou seja, degradando a parede celular, não participando, desta forma, ativamente do processo de infecção.

Herbert *et al.* (2004) identificaram um elemento de 27 pb no gene de uma pectinase do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, responsável pela indução em presença de pectina e durante o desenvolvimento do apressório. Esta seqüência localizada a -240 pb do TSS, mostra alta homologia com seqüências de ligação de fatores transcricionais envolvidos no desenvolvimento e acasalamento em leveduras. Uma busca por esta seqüência de 27 pb na região flanqueadora 5' do gene *chit1*, identificou um motivo muito similar e com localização próxima (-271) à identificada por Herbert *et al.* (2004). Esta seqüência pode ser responsável pela transcrição basal desta quitinase em presença de quitina para que o fungo possa desenvolver seus processos morfológicos.

Com os dados apresentados acima, surge a hipótese que o gene *chit1* possa ser regulado segundo o modelo proposto na figura 1. O promotor do gene *chit1* pode conter mais de três sítios de ligação para um repressor hipotético, além de uma seqüência de 27 pb, localizada a -271 pb em relação ao sítio de início de transcrição, responsável por uma transcrição reprimida em presença de quitina. Em presença de quitina essas proteínas repressoras hipotéticas podem se ligar a estes três sítios próximos às extremidades proximal e distal da região flanqueadora. Em presença de glicose, proteínas indutoras ocupariam, dois dos sítios de ligação dos repressores, ativando a transcrição do gene *chit1*.

Este trabalho abordou alguns dos possíveis elementos controladores da região flanqueadora 5' do gene *chit1*. Novas construções devem ser testadas de forma a cobrir todos os possíveis motivos encontrados pela análise *in silico*, além de verificar se estes sítios são funcionais *in vivo*.

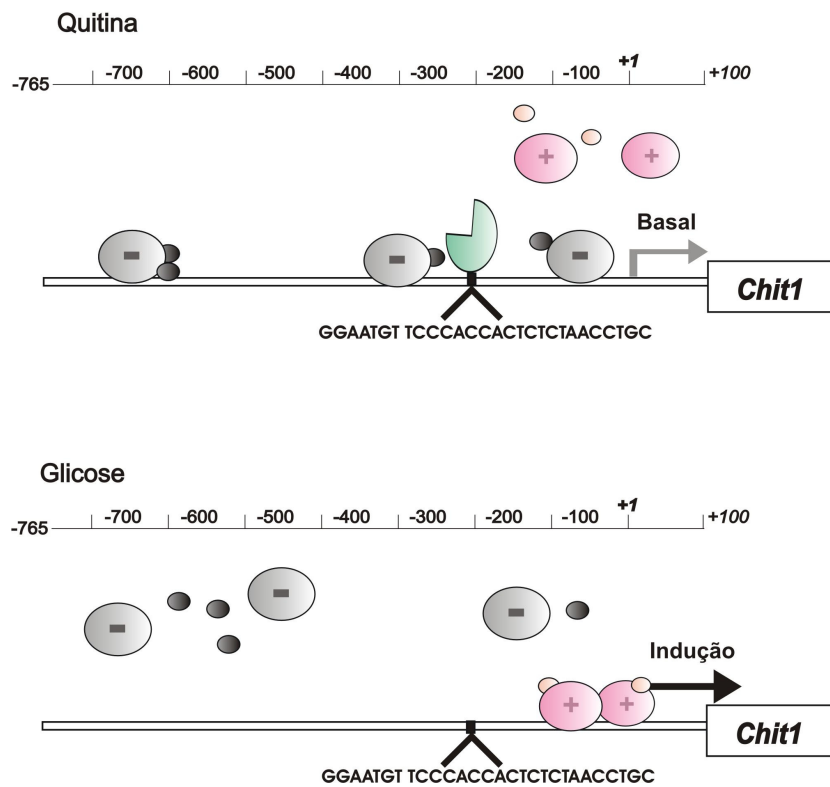


Figura 1 - Modelo proposto para regulação da transcrição do gene *chit1*. Painel A- Em presença de quitina, proteínas repressoras hipotéticas (-) ligam-se em sítio localizados dentro de uma porção de 372 pb na porção proximal e dentro de 198 pb na porção distal, impedindo a indução do gene *chit1*. O gene não é reprimido pela ligação de um fator (verde) em uma seqüência de 27 pb localizado à -271 pb em relação ao sítio de início de transcrição. Painel B- Em presença de glicose, proteínas indutoras hipotéticas (+) ligam-se à sítios induzindo a expressão do gene *chit1*. (●) Quitina; (○) Glicose

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

- O gene *chit1* não é reprimido em presença de glicose, pois foi expresso em ambas as condições testadas.
- Embora o nível de expressão da sGFP não tenha sido suficiente para a detecção por métodos mais diretos e mais simples, as metodologias de RT-PCR e western blot foram capazes de detectar a expressão dos transcritos e da proteína repórter sGFP.
- Uma seqüência de 765 pb da região flanqueadora 5' do gene *chit1* mostrou-se suficiente para expressar o gene repórter.
- Um fragmento distal de 393 pb da região promotora não é necessário para que ocorra a expressão do gene *chit1*, pois mesmo após a sua deleção, houve expressão do gene repórter.
- Uma seqüência encontrada dentro de 576 pb proximal parece ser necessária para que ocorra a expressão do gene *chit1*.
- A deleção de 198 pb que compreende o provável elemento *TATA box* não aboliu a transcrição do gene repórter, porém, foi suficiente para cessar a tradução. Isso sugere que como outros genes de fungos filamentosos o gene *chit1* utilize motivos alternativos para a ligação de TBP e início da transcrição.
- Os prováveis elementos de ligação para a proteína CREA parecem não ser funcionais, uma vez que o fragmento contendo sítio de ligação para o regulador de carbono não sofreu repressão catabólica em presença de glicose.

PERSPECTIVAS

- Usar fragmentos de DNA da região 5' do gene *chit1* para identificar as proteínas reguladoras de *M.anisopliae* usando extratos nucleares do fungo
- Analisar um número maior de transformantes.
- Gerar mutantes nulos para genes que codificam fatores reguladores encontrados na análise *in silico* neste estudo, analisando se a falta destes fatores interfere na expressão do gene *chit1*.
- Identificar o sítio de integração de cada construção no genoma de *Metarhizium anisopliae*.
- Isolar uma região de DNA maior que 765 pb da região 5' do gene *chit1* e verificar a presença de possíveis elementos reguladores presentes nesta região e que não foram aqui analisados.
- Imunolocalizar a quitinase CHIT42 para verificar se ocorre a sua secreção durante o processo de penetração e a presença na parede celular durante a formação do apressório.
- Testar diferentes condições de cultivo, como mudança de pH, estresse osmótico, temperatura, diferentes fontes de carbono e nitrogênio, depleção de nutrientes e analisar o envolvimento na expressão do gene *chit1*.

REFERÊNCIAS

- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTIÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p.719-739, 2005.
- ARRUDA, W.; LÜBECK, I.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 37, p. 231-244, 2005.
- BARATTO, C. M. Detecção e expressão de quitinases do entomatógeno e acaricida *Metarhizium anisopliae*. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. (2001).
- BARATTO, C.; DUTRA, V.; BOLDO, J.; LEIRIA, L.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Isolation, characterization and transcriptional analysis of the chitinase chi2 gene from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Current Microbiology**, v. 53, p. 217-221, 2006.
- BARRETO, C.C.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of *N*-acetylglucosamine in protein secretion. **Current Microbiology**, v. 48, p. 102-107, 2004.
- BOGO, M. R.; ROTA, C.A.; PINTO JR., H.; OCAMPOS, M.; CORREA, C. T.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: Isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. **Current Microbiology**, v. 37, p. 221-225, 1998.
- BURATOWSKI, S. The basics of basal transcription by RNA polymerase II. **Cell**, v. 77, p. 1-3, 1994..
- CHUAN, L.D. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**, v. 161, p. 345-360, 2006.
- CUBERO, B.; SCAZZOCCHIO, C. Two different adjacent and divergent zingfinger binding sites are necessary for CRE-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspegillus nidulans*. **EMBO Journal**, v. 13, p. 407-415, 1994.
- DANA, M. M.; LIMÓN, M. C.; MEJÍAS, R.; MACH, R. L.; BENÍTEZ, T.; PINTOR-TORO, J. A.; KUBICEK, C. P. Regulation of chitinase 33 (*chit33*) gene expression in *Trichoderma harzianum*. **Current Genetics**, v. 38, p. 335-342, 2001.

- DANA, M. D.; PINTOR-TORO, J. A. Post-transcriptional control of a glucoamylase gene from *Trichoderma harzianum* under stress conditions. **Molecular Microbiology**, v. 57, p. 250-260, 2005.
- DAVID, H.; KROGH, A. M.; ROCA, C.; AKESSON, M.; NIELSEN, J. CreA influences the metabolic fluxes of *Aspergillus nidulans* during growth on glucose and xylose. **Microbiology**, v. 151, p. 2209-2221, 2005.
- DENÍLSON, S. pH Regulation of Gene Expression in Fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 29, p. 61–71, 2000.
- DONG, C.; ZHANG, J.; CHEN, W.; HUANG, H.; HU, Y. Characterization of a newly discovered China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) for virulence to termites, isoenzyme, and phylogenetic analysis. **Microbiological Research** p. 1-8, 2006.
- DOWZER, C.; KELLY, J. Analysis of the creA Gene, a Regulator of Carbon Catabolite Repression in *Aspergillus nidulans*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 11, p. 5701-5709, 1991.
- DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; BROETTO, L.; SCHRANK, I.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 245-251, 2004..
- EMRI, T.; MOLNÁR, Z.; VERES, T.; PUSZTAHELYI, T.; DUDÁS, G.; PÓCSI, I. "Glucose-mediated repression of autolysis and conidiogenesis in *Emericella nidulans*. **Mycological research**, v. 110, p. 1172-1178, 2006.
- FANG, W.; LENG, B.; XIAO, Y.; JIN, K.; MA, J.; FAN, Y.; FENG, J.; YANG, X.; ZHANG, Y.; PEI, Y. Cloning of *Beauveria bassiana* Chitinase gene *Bbchit1* and Its Application To Improve Fungal Strain Virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 363-370, 2005.
- FENG, B.; XIAO, X.; MARZLUF, G. Recognition of specific nucleotide bases and cooperative DNA binding by the trans-acting nitrogen regulatory protein NIT2 of *Neurospora crassa* **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 3989-3996, 1993.
- FERNÁNDEZ-ÁBALOS, J. M.; FOX, H.; PITT, C.; WELLS, B.; DOONAN, J. H. "Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, v. 27, p. 121-130, 1998.
- FRAZZON, A.P.G.; VAZ JR., I. S.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 94, p. 117 – 125, 2000.

- FREIMOSER, F.M.; SCREEN, S.; BAGGA, S.; HU, G.; ST. LEGER, R. J. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. **Microbiology**, v. 149, p. 239-247, 2003.
- HERBERT, C.; JACQUET, C.; BOREL, C.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T.; DUMAS, B. A *cis*-acting sequence homologous to the yeast filamentation and invasion response element regulates expression of a pectinase gene from the bean pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.32, p. 29125-29131, 2002.
- IKE, M.; NAGAMATSU, K.; SHIOYA, A.; NOGAWA, M.; OGASAWARA, W.; OKADA, H.; MORIKAWA, Y. Purification, characterization, and gene cloning of 46 kDa chitinase (*Chit46*) from *Trichoderma reesei* PC-3-7 and its expression in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 71, p. 294-303, 2006.
- JAKES, A. K.; FUKAMIZO, T.; HALL, D.; BARTON, R. C.; ESCOTT, G. M.; PARKINSON, T.; HITCHCOCK, C. A.; ADAMS, D. J. Disruption of the gene encoding the ChiB1 chitinase of *Aspergillus fumigatus* and characterization of a recombinant gene product. **Microbiology**, v. 149, p. 2931–2939, 2003.
- JEKOSCH, K.; KÜCK, U. Glucose dependent transcriptional expression of the *cre1* gene in *Acremonium chrysogenum* strains showing different levels of cephalosporin C production. **Current Genetics**, v.37, p. 388-395, 2000.
- KUDLA, B.; CADDICK, M. X.; LANGDON, T.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; BENNETT, C. F.; SIBLEY, S.; DAVIES, R. W.; ARST JR., H. N. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. **The EMBO Journal**, v. 9, p. 1355-1364, 1990.
- LOPES, F. J. F.; ARAÚJO, E. F.; QUEIROZ, M.V. Easy detection of green fluorescent protein multicopy transformants in *Penicillium griseoroseum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, p. 449-455, 2004.
- MACH, R.; PETERBAUER, C. K.; PAYER, K.; JAKSITS, S.; WOO, S. L.; ZEILINGER, S.; KULLNIG, C. M.; LORITO, M.; KUBICEK, C.P. Expression of Two Major Chitinase Genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by Different Regulatory Signals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1858-1863, 1999.
- MARTINEZ, E.; CHIANG, C.M.; GE, H.; ROEDER, R. G. TATA-binding protein-associated factor(s) in TFIID function through the initiator to direct basal transcription from a TATA-less class 11 promoter. **The EMBO Journal**, v. 13, p. 3115-3126, 1994.
- MARZLUF, G.A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 17-32, 1997.

- MORAES, C. K.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. **Current Microbiology**, v. 46, p. 205–210., 2002.
- MORRIS, D. R. and GEBALLE, A. P. Upstream Open Reading Frames as Regulators of mRNA Translation. **Molecular and cellular Biology**, v. 20, p. 8635–8642, 2000.
- PEDRINI, N.; CRESPO, R.; JUÁREZ, M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C p. 1-14, 2006.
- PETERBAUER, C.K.; LITSCHER, D.; KUBICEK, C. P. The *Trichoderma atroviride* seb1 (stress response element binding) gene encodes an AGGGG-binding protein which is involved in the response to high osmolarity stress. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 268, p. 223-231, 2002.
- PINTO, A. S.; BARRETO, C. C.; SCHRANK, A.; ULHOA, J.; VAINSTEIN, M. H. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 322-327, 1997.
- RONNE, H. Glucose repression in fungi. **Trends in Genetics**, v. 11, p. 12-17, 1995.
- SCHOLTE, E. J.; KNOLS, B. G.J.; TAKKEN, W. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 91, p. 43 – 49, 2006.
- SCREEN, S.; BAILEY, A.; CHARNLEY, K.; COOPER, R.; CLARKSON, J. Carbon regulation of the cuticle-degrading enzyme PR1 from *Metarhizium anisopliae* may involve a trans-acting DNA-binding protein CCR1, a functional equivalent of the *Aspergillus nidulans* CREA protein. **Current Genetics**, v. 31, p. 511-518, 1997.
- SCREEN, S. E.; BAILEY, A.; CHARNLEY, K.; COOPER, R.; CLARKSON, J. Isolation of a nitrogen response regulator gene (*nrr1*) from *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v. 221, p. 17-24, 1998.
- SCREEN, S. E.; HU, G.; ST. LEGER, R. J. Transformants of *Metarhizium anisopliae* *sf. anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* *sf. acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 260-266, 2001.
- SEIDL, V.; SEIBOTH, B.; KARAFFA, L.; KUBICEK, C. P. The fungal STRE-element-binding protein Seb1 is involved but not essential for glycerol dehydrogenase (*gld1*) gene expression and glycerol accumulation in

- Trichoderma atroviride* during osmotic stress. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 1132-1140, 2004.
- SEIDL, V.; HUEMER, B.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C. P. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. **The FEBS Journal**, v. 272, p. 5923-5939, 2005.
- SILVA, M. V.; SANTI, L.; STAATS, C. C.; COSTA, S. M.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 382-392, 2005.
- SMALL, A.J.; TODD, R. B.; ZANKER, M. C.; DELIMITROU, S.; HYNES, M. J.; DAVIS, M. A. Functional analysis of TamA, a coactivator of nitrogen-regulated gene expression in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 265, p. 636-646, 2001.
- ST. LEGER, R.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proceeding of the Academy of Natural Sciences of USA Natrally Academy. Science. USA**, v. 93, p. 6349-6354, 1996.
- ST. LEGER, R.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. "Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*." **Applied Environmental. Microbiology**, v. 64, p. 709-713, 1998.
- STAATS, C.C.; SILVA, M. S. N.; PINTO, P. M.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. The *Metarhizium anisopliae trp1* gene: cloning and regulatory analysis. **Current Microbiology**, v. 49, p. 66-70, 2004.
- STRAUSS, J.; MACH, R. L.; ZEILINGER, S.; HARTLER, G. Cre1, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*. **FEBS Letter**, v. 376, p. 103-107, 1995.
- TAKAYA, N.; YAMAZAKI, D.; HORIYUKI, H.; OHTA, A.; TAKAGI, M. Intracellular chitinase gene from *Rhizopus oligosporus*: molecular cloning and characterization. **Microbiology**, v. 144, p. 2647-2654, 1998.
- VITERBO, A.; MONTERO, M.; RAMOT, O.; FRIESEN, D.; MONTE, E.; LLOBELL, A.; CHET, I. Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). **Current Genetics.**, v. 42, p. 114-122, 2002.
- WANG, C.; ST. LEGER, R. J. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. **PNAS**, v. 103, p. 6647-6652, 2006.

YAMAZAKI, H.; YAMAZAKI, D.; TAKAYA, N.; TAKAGI, M.; OHTA, A.; HORIUCHI, H. A chitinase gene, *chiB*, involved in the autolytic process of *Aspergillus nidulans*. **Current Genetics.**, v. 51,p. 89-98, 2007.

