

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

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SECRETADAS E QUITINASES DO
FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae***

Juliana da Silva Beringer

Porto Alegre
Setembro 2011

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SECRETADAS E QUITINASES DO
FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae***

Juliana da Silva Beringer

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Augusto Schrank

Porto Alegre
Setembro 2011

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia da UFRGS com a utilização da infraestrutura de Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massas (Uniprote-MS). O seqüenciamento do genoma de *Metarhizium anisopliae* E6 foi realizado no Laboratório Nacional de Computação Científica - LNCC. Este trabalho teve suporte financeiro do CNPq, CAPES e FINEP.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Fernanda Stanisçuaski

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

Dr. Alexandre Melo Bailão

Universidade Federal de Goiás

Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro

Universidade Estadual de Londrina

Dr. Charley Christian Staats

Membro Supletente da Banca Examinadora
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

À Deus, por não me deixar desanimar.

Ao meu orientador Prof. Augusto Schrank pela confiança e oportunidade dada a mim na IC e no Mestrado, pelas orientações a nível pessoal e profissional.

À Prof^a. Marilene H. Vainstein pelas colaborações e sugestões no andamento do meu trabalho.

À Prof^a. Ana Teresa Vasconcelos por disponibilizar o seqüenciamento do genoma de *M. anisopliae* E6 na Unidade de Genômica do LNCC.

À Prof^a. Célia R. Carlini por disponibilizar a infra-estrutura de Espectrometria de Massas do CBIOT (UNIPROTE-MS). Aos membros do UNIPROTE-MS, Jozi Estanislau e Prof. Charley Staats pelo auxílio na utilização do espectrômetro, ensinamentos e dicas para melhorar a qualidade das minhas amostras de proteínas. E também ao Prof. Charley Staats por ser o relator do meu manuscrito científico e da minha dissertação de Mestrado, obrigada pelas correções e sugestões.

Aos professores da banca Prof^a. Fernanda Stanisçuaski, Prof. Alexandre Melo Bailão, Prof^a. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro pela avaliação, sugestões e correções da minha dissertação.

Aos funcionários do CBIOT: Silvia Centeno, Luciano Saucedo, Grasiela Barbosa, e Seu Milton pela ajuda nos assuntos burocráticos e nas autoclavagens.

Aos colegas do laboratório 217 que me ajudaram a desenvolver meu trabalho: Juliano Boldo, Ângela Junges, Virginia Falcão, Leonardo Broetto. Em especial a minha colega e amiga Bárbara K. Souza pelo convite para ser tua colega na UFRGS, e o que tudo isso proporcionou: boas risadas, uma grande amizade, conselhos, ajudas e ensinamentos.

Aos colegas do laboratório 220: Melissa Landell, Lívia Kmetzsch, Carolina (Caru) Silveira, Walter Beys, Elisa Simon, Éder Oliveira, Vanessa Abreu, em especial a Juliana (Juli) Crestani e Lucélia Santi pelos ensinamentos e dicas de análises proteômicas, pois estes foram fundamentais para o meu trabalho.

A minha família, em especial minha mãe Janini S. Beringer e meu pai Mário H. M. Beringer, por tudo que vocês fizeram e fazem por mim, pelo apoio, paciência e compreensão durante mais esta etapa tão importante da minha vida. Obrigado por estarem sempre comigo, amo muito vocês.

Ao meu namorado Diego A. Nunes, por ser meu amigo quando mais precisei, pela paciência que teve comigo, você me deu força e disse muitas palavras de incentivo que me ajudaram a realizar este trabalho. Obrigada por tudo meu amor, te amo.

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES | ix |
| LISTA DE FIGURAS | xii |
| LISTA DE TABELAS | xiii |
| RESUMO | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 18 |
| 2.1 Características do <i>Metarhizium anisopliae</i> | 18 |
| 2.2 Quitinases: características e distribuição | 23 |
| 2.3 Estudos proteômicos com <i>Metarhizium anisopliae</i> | 30 |
| 3. OBJETIVOS | 32 |
| 3.1 Objetivo Geral | 32 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 32 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| 4.1.1 Linhagem utilizada, cultivo e manutenção de <i>Metarhizium anisopliae</i> ... | 33 |
| 4.1.2 Suspensão de esporos de <i>M. anisopliae</i> | 33 |
| 4.1.3 Condições de cultivo para extração de proteínas | 34 |
| 4.1.4 Quantificação das amostras de proteínas | 35 |
| 4.1.5 Eletroforese unidimensional (1-D) | 35 |
| 4.1.6 Eletroforese bidimensional (2-D) | 36 |
| 4.1.7 Atividade enzimática de quitinase | 37 |
| 4.1.8 Análise de quitinases por zimogramas | 38 |
| 4.1.9 Preparação de amostras para análise por espectrometria de massas | 39 |
| 4.2.0 Análise de proteínas por espectrometria de Massas (MS) | 40 |
| 4.2.1 Análise dos resultados de MS | 40 |
| 5. RESULTADOS | 42 |
| 5.1 Cultivos de <i>M. anisopliae</i> na presença de diferentes fontes de carbono | 42 |
| 5.2 Identificação das proteínas secretadas de culturas de <i>M. anisopliae</i> | 43 |
| 5.3 Análises das proteínas secretadas de <i>M. anisopliae</i> | 65 |

| | |
|--|-----|
| 5.4 Caracterização das proteínas secretadas de <i>M. anisopliae</i> através de ferramentas de bioinformática | 67 |
| 6. DISCUSSÃO | 80 |
| 7. CONCLUSÕES | 93 |
| 8. PERSPECTIVAS | 95 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 96 |
| ANEXOS | 118 |
| Anexo 1. Proteínas identificadas de <i>M. anisopliae</i> que não compreenderam o critério de identificação estabelecido para este trabalho | 119 |
| Anexo 2. Proteínas identificadas de <i>M. anisopliae</i> neste trabalho e seus números de EC (<i>Enzyme Commission number</i>) correspondentes | 123 |
| MINI-CURRICULUM | 124 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

| | |
|------------|--|
| ± | Mais ou menos |
| % | Porcento |
| Δ | Transformante nulo |
| 1:1 | 1 para 1 |
| 1-D | Eletroforese unidimensional |
| 2-D | Eletroforese bidimensional |
| α | Alfa |
| aa | Aminoácido |
| β | Beta |
| °C | Grau Celsius |
| C-terminal | Carboxi-terminal |
| CHAPS | 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano sulfonato |
| cm | Centímetro |
| Da | Dalton |
| DTT | Ditiotreitol |
| EC | <i>Enzyme Commission number</i> |
| EDTA | Sal Dissódico do Ácido Etilenodiaminotetraacético |
| ESI | Ionização por <i>Electrospray</i> |
| EST | <i>Expressed Sequence Tags</i> (Etiquetas de seqüências expressas) |
| g | Grama |
| GH | Glicosil hidrolase |
| GlcNAc | N-acetilglicosamina |
| h | Hora |
| IEF | Focalização Isoelétrica |
| kDa | Quilodalton |

| | |
|------------|---|
| LB | Meio Luria-Bertani |
| M | Molar |
| m/v | Massa por volume |
| MALDI | <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> (Ionização/dessorção por laser assistida por matriz) |
| MC | Meio de Cove |
| MCc | Meio de Cove completo |
| mg | Miligrama |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| MS | Espectrometria de massas |
| MS/MS | Espectrometria de massas com análise em tandem |
| N-terminal | Amino-terminal |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| ng | Nanogramas |
| nt | Nucleotídeos |
| ORF | <i>Open Reading Frame</i> (fase aberta de leitura) |
| PAGE | <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (eletroforese em gel de poliacrilamida) |
| pH | Potencial de hidrogênio iônico |
| pI | Ponto isoelétrico |
| Q ou QUAD | Quadrupolo |
| SABIA | <i>System for Automated Bacterial Integrated Annotation</i> |
| SDS | Dodecilsulfato de Sódio |
| TCA | Ácido tricloro acético |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamine |

| | |
|---------------|---|
| TFA | Ácido Tricloroacético |
| TOF | Tempo de voo |
| Tris | 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol |
| Triton X-100 | Éter octilfenólico de decaetilenoglicol |
| Tween | Polisorbitano |
| U | Unidade de atividade enzimática |
| μL | Microlitro |
| UV | Ultravioleta |
| V | Volts |
| V/h | Volts por hora |
| v/v | Volume por volume |
| x | Vezes |
| xg | Força G |
| γ | Gama |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Aspectos morfológicos de <i>M. anisopliae</i> | 19 |
| Figura 2. Etapas do ciclo de infecção de <i>M. anisopliae</i> no hospedeiro <i>Rhipicephalus microplus</i> | 22 |
| Figura 3. Estrutura química da quitina | 23 |
| Figura 4. Estrutura da cutícula de <i>Rhipicephalus microplus</i> | 24 |
| Figura 5. Organização estrutural dos domínios dos quatro subgrupos das quitinases fúngicas | 27 |
| Figura 6. Domínios das quitinases de <i>M. anisopliae</i> | 29 |
| Figura 7. Características morfológicas da colônia de <i>M. anisopliae</i> (linhagem E6) | 43 |
| Figura 8. Comparação entre as triplicatas dos perfis eletroforéticos 2-D de extratos protéicos de <i>M. anisopliae</i> cultivado por 96 h em meio suplementado com diferentes fontes de carbono | 44 |
| Figura 9. Perfil eletroforético 2-D das proteínas secretadas por <i>M. anisopliae</i> cultivado por 96 h na presença de diferentes fontes de carbono | 46 |
| Figura 10. Análise de zimogramas de quitinases das amostras de proteínas de culturas de 72 h de <i>M. anisopliae</i> na presença de GlcNAc 0,25% | 48 |
| Figura 11. Comparação entre as triplicatas dos perfis eletroforéticos 1-D de extratos protéicos de <i>M. anisopliae</i> cultivado por 72 h em meio suplementado com GlcNAc 0,25% | 49 |
| Figura 12. Perfil eletroforético 1-D das proteínas secretadas por <i>M. anisopliae</i> cultivado por 72 h na presença de GlcNAc 0,25% | 50 |
| Figura 13. Esquema das proteínas identificadas de <i>M. anisopliae</i> nos três diferentes cultivos | 66 |
| Figura 14. Cobertura dos peptídeos nas proteínas identificadas através de comparações com banco de dados de seqüências de proteínas, evidenciando a presença ou ausência de aminoácidos que compõem o peptídeo-sinal | 68 |
| Figura 15. Domínios das 38 proteínas identificadas de <i>M. anisopliae</i> (linhagem E6)... | 71 |
| Figura 16. Classificação funcional das proteínas identificadas de <i>M. anisopliae</i> pelo banco de dados do <i>Gene Ontology</i> (CO) | 77 |
| Figura 17. Classificação das proteínas identificadas de <i>M. anisopliae</i> conforme seu envolvimento com o fungo | 82 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Pragas da agricultura, pecuária e vetores de doenças suscetíveis à infecção por <i>M. anisopliae</i> | 20 |
| Tabela 2. Ensaio de atividade de quitinase com o substrato 4-MU-[GlcNAc]3 em amostras de proteínas de <i>M. anisopliae</i> na presença de GlcNAc 0,25% | 47 |
| Tabela 3. Resultados da identificação por espectrometria de massas de proteínas de sobrenadantes de cultivos de <i>M. anisopliae</i> na presença de glicose | 52 |
| Tabela 4. Resultados da identificação por espectrometria de massas de proteínas de sobrenadantes de cultivos de <i>M. anisopliae</i> na presença quitina | 54 |
| Tabela 5. Resultados da identificação por espectrometria de massas de proteínas de sobrenadantes de cultivos de <i>M. anisopliae</i> na presença GlcNAc | 56 |
| Tabela 6. Proteínas identificadas de <i>M. anisopliae</i> que foram detectadas em diferentes condições de cultivo | 66 |
| Tabela 7. Características das proteínas identificadas de <i>M. anisopliae</i> em relação a nucleotídeos, aminoácidos, íntrons, pI e massa molecular | 73 |
| Tabela 8. <i>Blastp</i> das proteínas identificadas de <i>M. anisopliae</i> linhagem E6 com as proteínas de <i>M. anisopliae</i> linhagem ARSEF23 | 78 |

RESUMO

Metarhizium anisopliae é considerado um organismo modelo para estudos relacionados com interações entre artrópodes e microrganismos. Durante estas interações ocorre a secreção de várias proteínas, incluindo enzimas hidrolíticas que degradam a cutícula do hospedeiro durante a etapa de penetração. As quitinases de *Metarhizium* vêm sendo alvo de muitos estudos, pois além de participar da degradação da cutícula, estas enzimas têm funções importantes na biologia do fungo, participando do remodelamento da parede celular. Este trabalho teve como objetivo identificar proteínas secretadas diferencialmente expressas durante o cultivo do fungo, em condições que mimetizam a interação com o hospedeiro e validar as quitinases propostas pela análise *in silico* do projeto genoma de *M. anisopliae*. Sobrenadantes de culturas do fungo na presença de glicose, quitina cristalina e N-acetilglicosamina foram analisados utilizando eletroforese uni e bidimensional seguida de análise por espectrometria de massas (MS). Através de comparação com bancos de dados (NCBI e proteínas preditas de *M. anisopliae*) identificamos 38 proteínas, das quais quatro são quitinases: a quitinase CHIT30 (*chi3*), a quitinase CHIT42 (*chit1*) e duas quitinases preditas pela análise *in silico*, as quitinases B4 e D1. Estas análises permitiram identificar algumas proteínas secretadas ainda não descritas para *Metarhizium* e validar duas novas quitinases.

ABSTRACT

Metarhizium anisopliae is considered a model organism for studies concerning interactions between arthropods and microorganisms. During these interactions the secretion of several proteins occurs, including hydrolytic enzymes that degrade the host cuticle during the penetration stage. *Metarhizium* chitinases have been the target of many studies, because, besides participating in the degradation of the cuticle, these enzymes have important functions in the biology of the fungus participating in the remodeling of the cell wall. This work aimed to identify secreted proteins differentially expressed during the growth of the fungus under conditions that mimic the interaction with the host, and to validate the chitinases proposed by *in silico* analysis of the *M. anisopliae* genome project. Supernatants from cultures of the fungus in the presence of glucose, crystalline chitin and N-acetylglucosamine were analyzed using one and two-dimensional gel electrophoresis followed by analysis by mass spectrometry (MS). Through comparison with databases (NCBI and predicted proteins of *M. anisopliae*) we identified 38 proteins, four of which are chitinases: chitinase CHIT30 (*chi3*), chitinase CHIT42 (*chit1*) and two chitinases predicted by *in silico* analysis, chitinases B4 and D1. This analysis allowed the identification of some undescribed proteins secreted by *Metarhizium* and validated two new chitinases.

1. INTRODUÇÃO

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é utilizado como alternativa aos pesticidas químicos no controle biológico de vários insetos pragas. Este fungo possui uma ampla gama de hospedeiros incluindo pragas da agricultura, pecuária e vetores de doenças. Devido a esta versatilidade, *M. anisopliae* pode ser considerado modelo de estudo para interações entre artrópode-microrganismo (Blanford *et al.*, 2005), assim como estudos a nível molecular, celular, genético, bioquímico e fisiológico (Arruda *et al.*, 2005; Boldo *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009; Boldo *et al.*, 2010; Broetto *et al.*, 2010).

Para transpor a cutícula de seus hospedeiros, o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* utiliza dois mecanismos: (i) pressão mecânica, com uma estrutura chamada de apressório e (ii) hidrólise enzimática, com a secreção de várias enzimas (Schrank & Vainstein, 2010), que degradam o exoesqueleto. Neste processo de interação e penetração do fungo no hospedeiro uma série de proteínas é secretada. Elucidar estas interações é fundamental para caracterizar genes e proteínas essenciais para a patogenicidade deste organismo e assim compreender o processo de infecção deste fungo em seus hospedeiros.

O exoesqueleto dos artrópodes é a principal barreira contra seus patógenos e possui como componente principal a quitina (Arruda *et al.*, 2005). Quitinases degradam a quitina através da hidrólise nas ligações β -1,4-N-acetilglicosamina. Muitos organismos possuem quitinases, incluindo: fungos, bactérias, insetos, plantas, vírus e animais (Duo-Chuan, 2006). Em fungos filamentosos, as quitinases possuem múltiplas funções biológicas incluindo nutrição, autólise e morfogênese (Adams, 2004).

As quitinases estão presentes em diversos organismos e em número variável entre os genomas estudados. Seidl (2008), através de uma análise *in silico* em bancos de seqüências verificou que nos genomas de fungos filamentosos é possível encontrar entre 10 e 25 quitinases. Até o momento, apenas seis quitinases do fungo *Metarhizium* sp. foram caracterizadas e somente três genes foram identificados. Junges (2010) por análise *in silico* da seqüência do genoma de *M. anisopliae* (linhagem E6) encontrou, além dos três genes já identificados (*chit1*, *chi2* e *chi3*), outras 20 ORFs de quitinases putativas.

Uma das estratégias utilizadas para validar experimentalmente uma análise *in silico* é a demonstração de que a proteína pode ser sintetizada. Para isso, estudos de análises proteômicas são interessantes metodologias, pois podem utilizar técnicas de separação de proteínas (eletroforese), seguida de identificação por espectrometria de massas. Estas análises são importantes abordagens para verificar a funcionalidade do genoma, permitindo estudar a estrutura, a função e o controle dos sistemas biológicos através das várias propriedades das proteínas.

Com o intuito de identificar as quitinases propostas pela análise *in silico* e também caracterizar outras proteínas secretadas que participem do processo de penetração do fungo *M. anisopliae* em seus hospedeiros, o presente trabalho utiliza duas metodologias: (i) separação de proteínas de sobrenadantes de culturas do fungo na presença de diferentes substratos, utilizando eletroforese uni e bidimensional; e (ii) a identificação por espectrometria de massas de algumas proteínas selecionadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características do *Metarhizium anisopliae*

O fungo filamentoso e entomopatígeno *Metarhizium anisopliae* foi descrito pela primeira vez em 1879, por Metschnikoff, na Rússia como *Entomophora anisopliae*, isolado a partir de larvas de besouro-do-grão-do-trigo (*Anisopliae austriaca*, Coleoptera:Scarabaeidae); (Alves, 1998; Driver *et al.*, 2000) porém em 1883, Sorokin o descreveu com um novo gênero chamado *Metarhizium*.

Metarhizium anisopliae é classificado pelo banco de dados de nomenclatura *Index Fungorum Partnership* (<http://www.speciesfungorum.org/>) como pertencente ao filo *Ascomyceto*, classe *Sordariomycete*, ordem *Hipocreales* e família *Clavicipitaceae*.

Com base em critérios morfológicos e moleculares, Driver *et al.* (2000) revisaram a taxonomia do gênero *Metarhizium* e reconheceram três espécies para este gênero, subdivididas em variedades: *M. anisopliae* (var. *anisopliae*, var. *majus*, var. *lepidiotum* e var. *acridum*); *M. flavoviride* (var. *flavoviride*, var. *minus*, var. *novazealandicum* e var. *pemphigum*) e *M. album*. Entretanto Bischoff *et al.* (2009), revisaram novamente o gênero *Metarhizium* através de análises filogenéticas deste complexo, tendo elevado algumas variedades para o nível de espécie e propondo o reconhecimento de onze espécies para este gênero: *M. anisopliae*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, *M. majus*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. globosum*, *M. robertsii*, *M. brunneum*, *M. flavoviride* e *M. frigidum*.

Morfologicamente *M. anisopliae* apresenta-se como um fungo filamentoso de micélio hialino e septado, com conidióforos característicos, dos quais emergem conídios cilíndricos organizados em colunas, geralmente uninucleados, com coloração esverdeada quando maduros (Figura 1) (Bischoff *et al.*, 2009). Segundo Driver *et al.* (2000) normalmente desenvolvem-se em temperaturas na faixa de 15°C a 32°C, embora tenham sido encontrados dois isolados em baixas temperaturas, no solo da Ilha *Macquarie* (entre Nova Zelândia e Antártida). O gênero *Metarhizium* possui uma ampla distribuição geográfica, com representantes em todos os continentes, com exceção da Antártida

(Roberts & St Leger, 2004), pode ser encontrado em solos, rizosfera de plantas (Hu & St Leger, 2002) e cadáveres de artrópodes, como saprófitas ou parasitas (Wang *et al.*, 2005; Schrank & Vainstein, 2010).

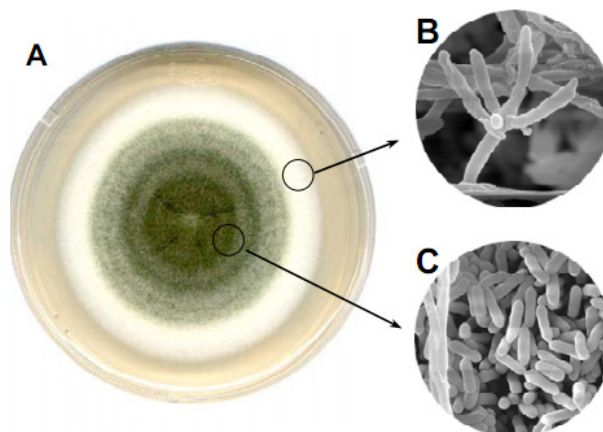


Figura 1. Aspectos morfológicos de *M. anisopliae*. Colônia após 21 dias de cultivo em meio de Cove completo (MCc) a 28°C. **A.** Micélio hialino na extremidade da colônia. **B.** Conidióforos. **C.** Esporos. Modificado de Staats (2007) e Arruda *et al.* (2005).

Os fungos entomopatogênicos são importantes controladores naturais de artrópodes e podem ser utilizados como bioinseticidas. A utilização destes fungos como método alternativo para o controle químico, apresenta grandes vantagens em relação aos pesticidas químicos como: a redução dos impactos ambientais (no solo, clima, fauna e flora), redução de custos, baixa toxicidade para outros organismos, alta taxa de especificidade aos hospedeiros e a redução no desenvolvimento de organismos resistentes (Alves, 1998; Milner, 2000; Shah & Pell, 2003; He & Xia, 2009).

O fungo *M. anisopliae* tem sido extensivamente estudado como um organismo chave para o biocontrole, muito versátil pode infectar aproximadamente mais de 200 espécies de artrópodes (Alves, 1998; Driver *et al.*, 2000), de diferentes Ordens: Diptera, Isoptera, Hemiptera, Homoptera, Coleoptera, Dytioptera, Orthoptera, Lepdoptera e Acarina. Alguns de seus hospedeiros estão ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1. Pragas da agricultura, pecuária e vetores de doenças suscetíveis à infecção por *M. anisopliae*.

| Pragas | Nome científico | Nome popular | Referência |
|-----------------------|---|--------------------------------|--|
| Pragas da agricultura | <i>Diabrotica undecimpunctata</i> | Verme da raiz do milho | Krueger & Roberts, 1997 |
| | <i>Otiorhynchus sulcatus</i> | Gorgulho da videira | Bruck, 2005 |
| | <i>Hoplia philantjuz</i> | Besouro | Ansari <i>et al.</i> , 2004 |
| | <i>Musca domestica</i> | Mosca | Barson <i>et al.</i> , 1994 |
| | <i>Ceratitis capitata</i> | Mosca das frutas | Mochi <i>et al.</i> , 2006 |
| | <i>Locusta migratoria</i> | Gafanhoto | Lomer <i>et al.</i> , 2001 |
| | <i>Schistocerca gregaria</i> | Gafanhoto do deserto | Nowierski <i>et al.</i> , 1996 |
| | <i>Dysdercus peruvianus</i> | Percevejo manchador do algodão | Lubeck <i>et al.</i> , 2008 |
| | <i>Mahanarva posticata</i> , <i>M. frimbriolata</i> | Cigarrinha da cana-de-açúcar | Alves, 1998 |
| | <i>Deois flavopicta</i> | Cigarrinha das pastagens | Alves, 1998 |
| | <i>Manduca sexta</i> | Lagarta da folha do tabaco | St Leger <i>et al.</i> , 1996b |
| Pragas da pecuária | <i>Rhipicephalus microplus</i> | Carrapato bovino | Frazzon <i>et al.</i> , 2000; Polar <i>et al.</i> , 2005 |
| Vetores de doenças | <i>Anopheles gambiae</i> | Vetor da malária | Scholte <i>et al.</i> , 2003 |
| | <i>Culex quinquefasciatus</i> | Vetor da filariose | Scholte <i>et al.</i> , 2003 |
| | <i>Triatoma infestans</i> | Vetor da doença de Chagas | Juárez <i>et al.</i> , 2000 |
| | <i>Glossina</i> spp. | Vetor da doença do sono | Kaaya & Munyinyi, 1995 |

Os fungos entomopatogênicos infectam seus hospedeiros por penetração direta nos exoesqueletos ou cutículas (St. Leger *et al.*, 1991b; Clarkson & Charnley, 1996), sem a

necessidade da ingestão. Geralmente reconhecem a suscetibilidade dos hospedeiros quimicamente ou pela topografia do exoesqueleto (Pedrini *et al.*, 2007). A infecção do fungo *M. anisopliae* em artrópodes, ocorre em fases sucessivas de adesão, germinação, diferenciação, penetração, colonização, extrusão, reprodução e dispersão (Figura 2) (Alves, 1998; Schrank *et al.*, 1993; Arruda *et al.*, 2005).

O processo de infecção do fungo *M. anisopliae* inicia pela produção assexuada dos conídios, sendo dispersos no ambiente. Após entrar em contato com o hospedeiro suscetível, o conídio se fixa na cutícula, com o auxílio de proteínas, como: adesina MAD1 (Wang & St Leger, 2007), quinase MaPKA1 (Fang *et al.*, 2009) e hidrofobinas (Wessels, 2000), que estão presentes na superfície do esporo e possuem propriedades de adesão, dando início a uma série de reações enzimáticas de reconhecimento entre fungo e hospedeiro (Shah & Pell, 2003).

Depois da adesão, o esporo germina e o tubo germinativo, na sua porção distal, se diferencia por dilatação formando uma estrutura utilizada para penetração chamada de apressório (Arruda *et al.*, 2005). O apressório realiza pressão mecânica no exoesqueleto e juntamente com a secreção de enzimas hidrolíticas como proteases (St. Leger *et al.*, 1987), quitinases (*chi2*, *chi3*) (Staats, 2007; Boldo *et al.*, 2009) e lipases (Silva *et al.*, 2009), ocorre a penetração do fungo no hospedeiro. O processo de infecção tem início somente com a transposição do exoesqueleto pelo fungo.

Para colonizar o hospedeiro, as hifas atravessam a cutícula e entram em contato com a hemolinfa. Na hemolinfa ocorre novamente a diferenciação das hifas, em estruturas chamadas de blastosporos, que são hifas unicelulares que conseguem burlar a resposta do sistema imune e se dispersar pelo interior do artrópode (Clarkson & Charnley, 1996; Zhang & Xia, 2008). Além disso, ocorre a produção de metabólitos secundários como as destruxinas (toxinas fúngicas), afetando a resposta imune humoral (Pal *et al.*, 2007), auxiliando o fungo na colonização completa do hospedeiro após a penetração (St. Leger *et al.*, 1991b; Hsiao & Ko, 2001).

O tempo médio de morte dos organismos hospedeiros é de cinco a dez dias (St Leger *et al.*, 1996c; Frazzon *et al.*, 2000). Após a morte do inseto, as hifas se desenvolvem invadindo diversos órgãos internos, explorando as fontes nutricionais de seus hospedeiros.

Com o esgotamento desses, as hifas emergem formando um micélio, que cobre a superfície do tegumento, produzindo esporos que poderão ser dispersos no ambiente e infectar outros hospedeiros (Shah & Pell, 2003).

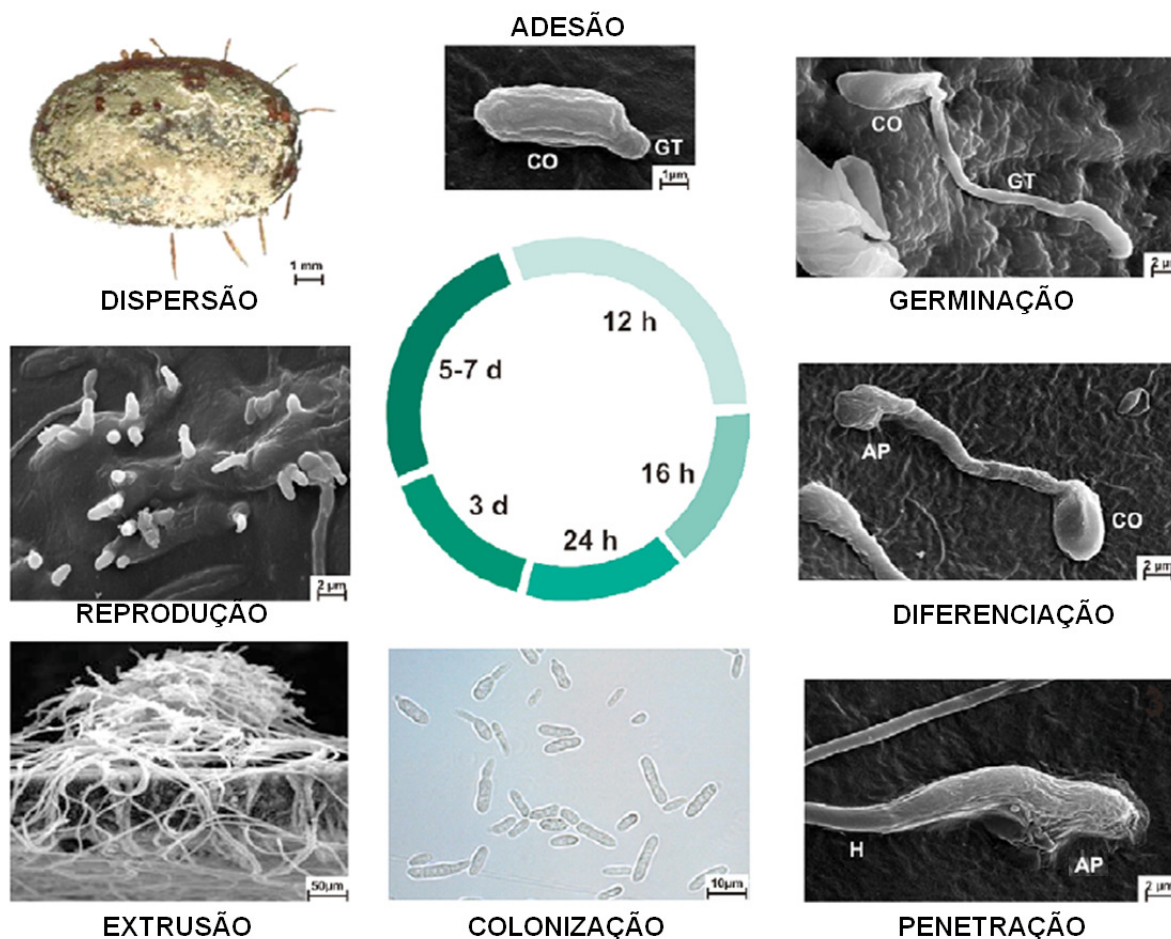


Figura 2. Etapas do ciclo de infecção de *M. anisopliae* no hospedeiro *Rhipicephalus microplus*. Estão representadas as fases de infecção de *M. anisopliae* em seus hospedeiros. Modificado de Schrank & Vainstein (2010). **CO:** Conídio. **GT:** Tubo germinativo. **AP:** Apressório. **H:** Hifa.

O ciclo de vida de *M. anisopliae* pode ser dividido em duas partes: uma parte habitando o solo e outra parte em seus hospedeiros (Quesada-Moraga *et al.*, 2007). No solo ou no inseto, o fungo pode persistir por um longo período, mesmo sob condições ambientais desfavoráveis (Hajek *et al.*, 2007). Em seus hospedeiros, *M. anisopliae* utiliza

enzimas hidrolíticas para sobrepujar as defesas e destruir a integridade dos artrópodes, um exemplo destas enzimas são as quitinases.

2.2 Quitinases: características e distribuição

A quitina, polímero formado por subunidades de N-acetilglicosamina unidas por ligações β -1,4 (Figura 3), é amplamente distribuída na natureza. Acredita-se ser o segundo mais abundante e renovável polímero, depois de celulose (Duo-Chuan, 2006). Pode apresentar três conformações de arranjos: forma α , todas as cadeias possuem orientação anti-paralela; forma β , as cadeias estão dispostas em forma paralela; e forma γ , as cadeias são agrupadas em conjuntos de três linhas, sendo que duas formam orientação paralelas e uma orientação anti-paralela (Merzendorfer & Zimoch, 2003).

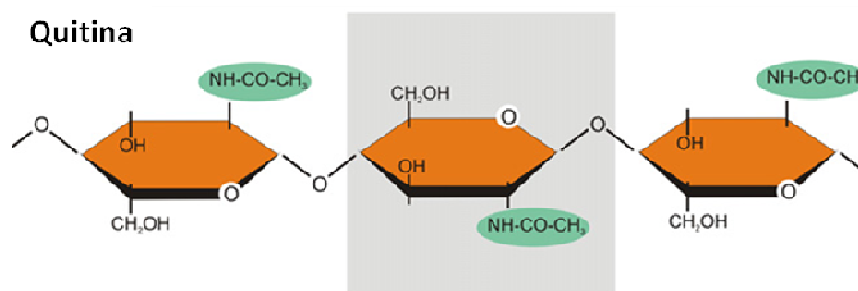


Figura 3. Estrutura química da quitina. Os círculos em verde indicam as subunidades de N-acetilglicosamina. Modificado de Seidl (2008).

Este polímero é o componente principal da parede celular de fungos, exoesqueleto de artrópodes e integumento de crustáceos (Merzendorfer & Zimoch, 2003; Latgé, 2007), não sendo detectada em plantas e vertebrados (Funkhouser & Aronson, 2007).

Em fungos filamentosos, quitina e outros polissacarídeos representam 90% da parede celular, conferindo proteção contra: fatores ambientais, dissecação e pressão osmótica (Latgé, 2007).

Nos artrópodes, as microfibrilas de quitina constituem 30% da cutícula (Kramer *et al.*, 1995). A cutícula é composta por três camadas principais: epicutícula (cutícula externa), procutícula (dividida em exo e endocutícula) e a epiderme (camada celular) (Figura 4). A epicutícula é composta de lípideos e ceras, e a procutícula é composta por fibras de quitina embebidas em uma matriz protéica. Com estas três camadas, a cutícula dos insetos constitui a maior barreira contra a penetração (St. Leger *et al.*, 1991a), por este motivo os microrganismos necessitam da ação conjunta de várias enzimas, para a degradação desta cutícula e posterior penetração.

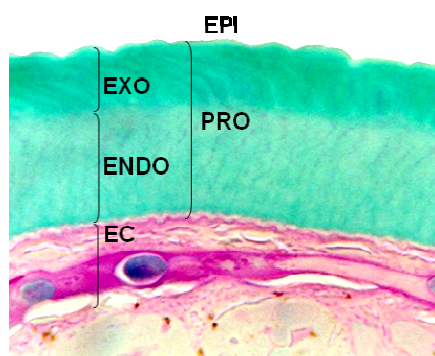


Figura 4. Estrutura da cutícula de *Rhipicephalus microplus*. Fotomicrografia de microscopia óptica evidenciando as camadas da cutícula de artrópodes. **EPI.** Epicutícula, **PRO.** Procutícula, **EXO.** Exocutícula; **ENDO.** Endocutícula; **EC.** Células epitérmicas. Modificado de Arruda *et al.*, 2005.

Quitinases são as enzimas que realizam hidrólise nas ligações β -1,4-N-acetilglicosamina, degradando a quitina. Estas enzimas estão presentes em vários organismos (Duo-Chuan, 2006), possuindo diferentes funções: em artrópodes estão associadas com a morfogênese, através da degradação da cutícula velha para o crescimento (Merzendorfer & Zimoch, 2003); nas plantas, atuam na defesa contra patógenos fúngicos (Iseli *et al.*, 1996; Kasprzewska, 2003); nos vírus possuem atuação na patogênese (Patil *et al.*, 2000); nas bactérias, são necessárias para o parasitismo e digestão da quitina como fonte nutricional (Cohen-Kupiec & Chet, 1998; Patil *et al.*, 2000); e nos vertebrados, atuam como um mecanismo de resistência contra patógenos (Patil *et al.*, 2000; Merzendorfer & Zimoch, 2003).

Em fungos filamentosos, as quitinases possuem múltiplas funções, que incluem: (i) nutrição, através da degradação da quitina exógena (cutícula de artrópodes) e do uso de produtos da degradação como fonte de nutriente; (ii) morfogênese, com o remodelamento da parede celular, nas fases de crescimento, ramificação, fusão e autólise; e (iii) na competição e defesa de habitat, contra outros fungos e artrópodes (Adams, 2004; Seidl, 2008).

As enzimas quitinolíticas podem ser divididas em N-acetilglicosaminidases e quitinases, de acordo com seus padrões de clivagem (Seidl, 2008). As N-acetilglicosaminidases (EC. 3.2.1.52) liberam monômeros de N-acetilglicosamina a partir de quatro, três ou duas moléculas de N-acetilglicosamina. As quitinases são classificadas em: endoquitinases (EC. 3.2.1.14), que clivam a molécula de quitina aleatoriamente nos sítios internos gerando multímeros solúveis de N-acetilglicosamina, com quatro, três ou duas moléculas de N-acetilglicosamina; e exoquitinases (EC. 3.2.1.29), que fazem a liberação gradual de duas moléculas de N-acetilglicosamina, a partir de extremidades não redutoras (Sahai & Manocha, 1993; Duo-Chuan, 2006; Seidl, 2008).

As quitinases são classificadas como Glicosil Hidrolases (GH), podendo ser da família 18, 19 e 20. A família GH18 é encontrada em bactérias, fungos, leveduras, vírus, plantas e animais; a família GH19 é exclusivamente presente em plantas; e a família GH20 consiste em β -N-acetilglicosaminidases de bactérias, fungos e humanos (Duo-Chuan, 2006). Seidl (2008) classifica as quitinases apenas como GH18 e GH19.

Após uma análise *in silico* de 25 genomas de fungos, Seidl (2008) classificou as quitinases fúngicas como exclusivas da família GH18. Esta família apresenta uma estrutura de multi-domínios, compreendendo: (i) o domínio N-terminal, que pode conter ou não peptídeo-sinal (sinal de secreção); (ii) o domínio catalítico, onde ocorre a hidrólise do substrato; (iii) uma região rica em serina/treonina, normalmente glicosilada pós-traducionalmente gerando a proteína madura; (iv) uma região de ligação ao substrato (quitina) e (v) a região C-terminal (Kuranda & Robbins, 1991; Duo-Chuan, 2006; Boldo, 2009).

Seidl (2008), através de uma análise filogenética das seqüências de aminoácidos, propôs uma nova classificação para a família GH18, dividindo em três subgrupos (Figura

5). O subgrupo A abrange a antiga Classe V (fungo/bactéria), possui o domínio catalítico GH18, podendo apresentar ou não peptídeo-sinal, as massas moleculares deste subgrupo variam de 40 a 50 kDa, acredita-se que quitinases deste grupo tem provável atuação na morfogênese. O subgrupo B abrange a antiga Classe III (fungo/planta), possui o domínio catalítico GH18, peptídeo-sinal, podendo conter ou não domínios de ligação a carboidrato (celulose/quitina), com quitinases variáveis no tamanho sendo entre 30 a 90 kDa, as quitinases deste grupo tem provável atuação na patogênese. O subgrupo C é um novo subgrupo de quitinases de fungos, com massa molecular maiores (acima de 140 kDa), apresentam peptídeo-sinal, domínio catalítico GH18, domínio de ligação a quitina e domínio LysM (Peptideoglicano), quitinases deste subgrupo ainda não possuem função caracterizada.

Além destes três subgrupos propostos, Junges (2010) através de análises do genoma de *M. anisopliae* propôs o subgrupo D, com quitinases que não se agruparam aos outros subgrupos, possuindo massa molecular em torno de 36 kDa, peptídeo-sinal e domínio catalítico GH18. Uma característica deste subgrupo é não possuir íntrons, por este motivo as quitinases deste subgrupo são filogeneticamente mais próximas de quitinases bacterianas.

Metarhizium sp. possui apenas seis quitinases identificadas: a CHIT33 e CHIT110 (St. Leger *et al.*, 1991a), CHIT43,5 e CHIT45 (St Leger *et al.*, 1996b), CHIT30 (Pinto *et al.*, 1997), CHIT42 (Baratto *et al.*, 2003); e três genes foram descritos *chit1* (Bogo *et al.*, 1998), *chi2* (Baratto *et al.*, 2006) e *chi3* (da Silva *et al.*, 2005).

As quitinases CHIT33 e CHIT110 foram purificadas a partir de cultivos de sobrenadante de *M. anisopliae* (linhagem ME1) na presença de quitina por St. Leger (1991a). A CHIT33 possui massa molecular de 33 kDa (CHIT33) com atividade de endoquitinase e a CHIT110 possui 110 kDa com atividade de N-acetilglicosaminidase.

St. Leger *et al.* (1996b) detectaram duas quitinases CHIT43,5 e CHIT45, a partir de zimogramas de atividade quitinolítica, de sobrenadantes de cultivos de *M. anisopliae* (linhagem ME1) em presença de cutícula de *M. sexta*. Essas duas quitinases possuem atividade de endoquitinase.

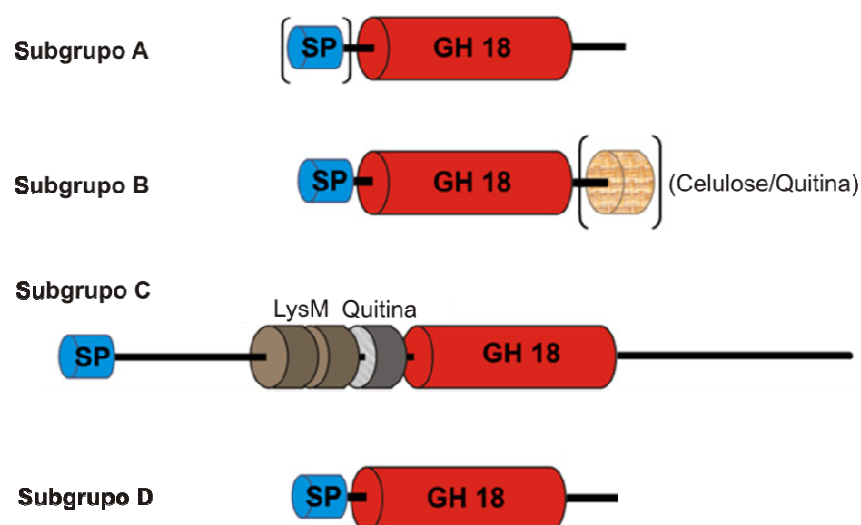


Figura 5. Organização estrutural dos domínios dos quatro subgrupos das quitinases fúngicas. SP. Peptídeo-sinal. GH18. Domínio catalítico. Celulose/Quitina. Domínio de ligação a carboidrato. LysM. Domínio de ligação peptidoglicano. Quitina. Domínio de ligação ao substrato. Modificado de Seidl (2008).

O gene *chit1* (Bogo *et al.*, 1998), codifica a quitinase CHIT42. Baratto *et al.* (2003) caracterizaram a CHIT42 através da expressão em *Escherichia coli*, resultando em uma proteína com massa molecular de 42 kDa e atividade de endoquitinase. Baratto *et al.* (2003) superexpressaram este gene em *M. anisopliae* (linhagem E6) e observaram que os níveis de atividade quitinolítica aumentaram, porém não ocorreu alterações na virulência do fungo contra a lagarta *M. sexta* (Screen *et al.*, 2001). Acredita-se que esta quitinase esteja envolvida com a morfogênese do fungo e provavelmente, de acordo com a nova classificação, pertenceria ao subgrupo A.

O gene *chi2* codifica a quitinase CHIT2 (Baratto *et al.*, 2006), com massa molecular de 42 kDa e atividade de endoquitinase. Boldo *et al.* (2009), através de experimentos com transformantes nulos e superexpressos deste gene, apresentaram diferenças nos níveis de virulência do fungo *M. anisopliae* (linhagem E6) em bioensaios com *D. peruvianus*. Esta quitinase provavelmente está envolvida com a patogênese do fungo, pertencendo ao subgrupo B (Seidl *et al.*, 2005). Em outro trabalho, Boldo *et al.* (2010) evidenciaram que o gene *chi2* sofre *splicing* alternativo, produzindo dois tipos de

transcritos: o *chi2(1)* retém o íntron 2, enquanto que o *chi2(2)* é completamente processado; estes transcritos são traduzidos e geram duas proteínas diferentes.

E o gene *chi3*, codifica a quitinase CHIT30 (da Silva *et al.*, 2005), com atividade de endo e exoquitinase. Esta quitinase foi identificada a partir de sobrenadantes de cultivo de *M. anisopliae* (linhagem E6) na presença de quitina (Pinto *et al.*, 1997). Staats (2007) construiu transformantes nulos para este gene, sem nenhuma alteração morfológica, porém com a patogenicidade reduzida contra *D. peruvianus*. O $\Delta chi3$ apresentou menor virulência e menor tolerância quando exposto a altas temperaturas (42°C), e os transformantes superexpressos para o gene *chi3* não foram viáveis. Esta quitinase provavelmente também tem atuação na patogênese do fungo, e pelo trabalho de Seidl *et al.* (2005) classifica-se no subgrupo B.

Estudos anteriores acreditavam que o processo de penetração no hospedeiro não dependia de um único gene ou proteína, existindo então um sinergismo entre as várias hidrolases (St. Leger *et al.*, 1997). Porém em estudos utilizando a transformação de apenas um gene de *M. anisopliae* (*chi2* e *chi3*) (Staats, 2007; Boldo *et al.*, 2009) mostrou ocorrer alterações na virulência do fungo, evidenciando que os genes não são redundantes como se acreditava. Seidl (2008), através de uma análise *in silico* em bancos de seqüências verificou que nos genomas bacterianos em geral são encontradas de duas a quatro quitinases e nos genomas de fungos filamentosos é possível encontrar entre 10 e 25 quitinases. Junges (2010) realizou a análise das quitinases *in silico* do genoma de *M. anisopliae* (linhagem E6) por comparação com genomas de organismos ortólogos, encontrou além dos três genes já identificados (*chit1*, *chi2* e *chi3*), outras 20 ORFs de quitinases putativas (Figura 6): nove pertencentes ao subgrupo A, sete ao subgrupo B, quatro ao subgrupo C e três ao subgrupo D. No início deste ano, o genoma de *M. anisopliae* (linhagem ARSEF 23) e *M. acridum* foram seqüenciados (Gao *et al.*, 2011), identificando 30 quitinases em *M. anisopliae* e 21 quitinases em *M. acridum*. O motivo para este grande número de quitinases em *M. anisopliae* ainda está desconhecido.

As quitinases sob condições de cultura são reguladas por um sistema indutor/repressor, no qual atuam como indutores: quitina, carapaça de artrópodes e baixas concentrações de N-acetilglicosamina; e como repressores: glicose e altas concentrações de N-acetilglicosamina (Krieger *et al.*, 2003; da Silva *et al.*, 2005; Baratto *et al.*, 2006).

A caracterização do sistema quitinolítico é necessária para obter informações sobre a função de cada quitinase na morfologia e patogênese do fungo *M. anisopliae*. Por este motivo, o presente trabalho utilizou estratégias proteômicas a fim de validar e caracterizar as quitinases propostas pela análise *in silico*.

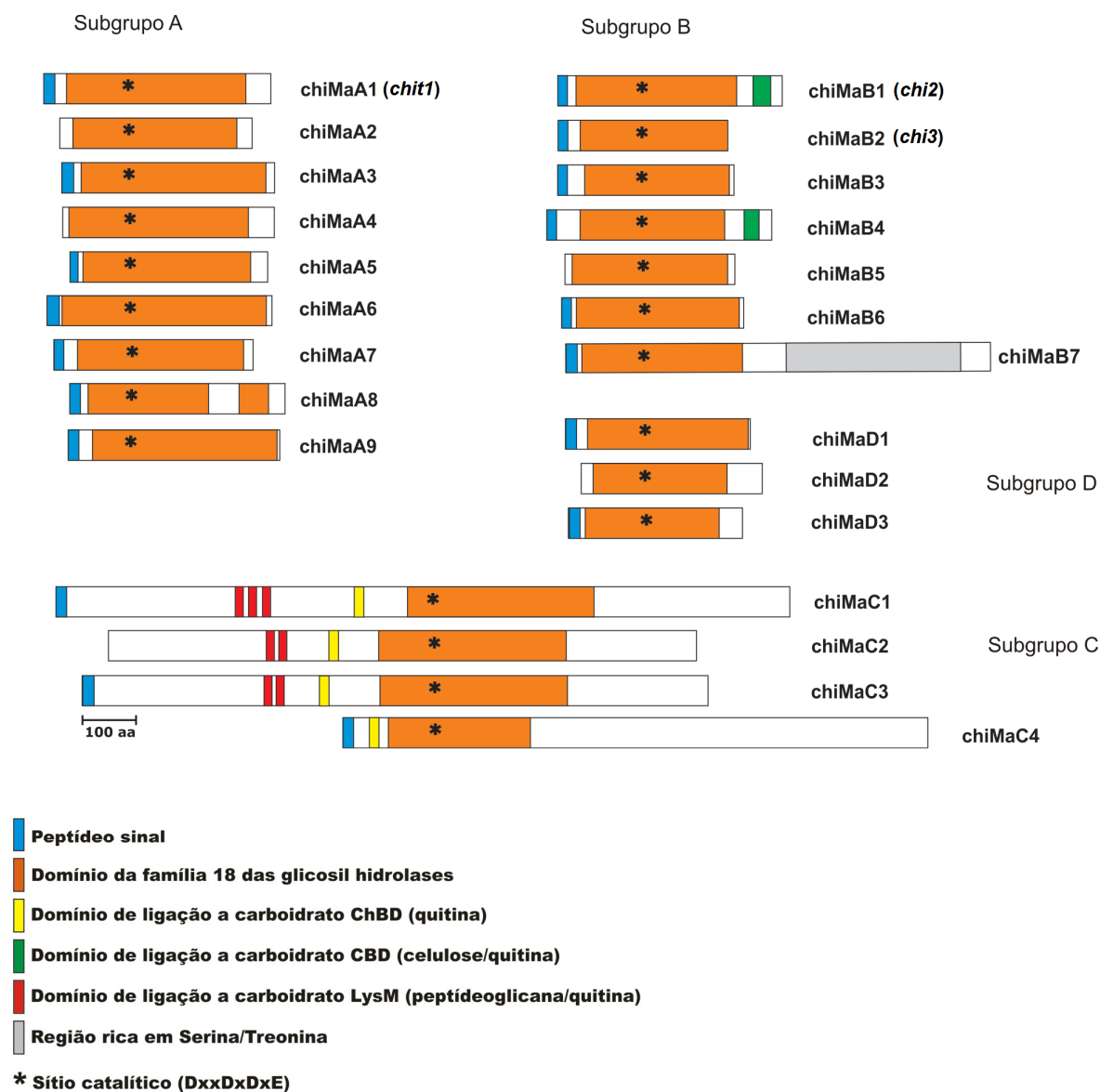


Figura 6. Domínios das quitinases de *M. anisopliae*. Modificado de Junges (2010).

2.3 Estudos proteômicos com *Metarhizium anisopliae*

Paralelo com a disponibilização de dados genômicos de um determinado organismo se faz necessário técnicas que estudem a funcionalidade deste genoma, possibilitando elucidar alguns de seus processos biológicos. As análises proteômicas proporcionam analisar o conjunto de proteínas expressas a partir de um genoma, permitindo caracterizar quais proteínas estão sendo realmente expressas na célula (em um determinado momento e condição), em quais níveis estas expressões estão ocorrendo e quais as eventuais modificações pós-traducionais (Silva *et al.*, 2007). Nestas análises dois princípios são utilizados: o de separação e o de identificação das proteínas.

Uma das técnicas utilizadas para a separação de proteínas é a eletroforese, que pode ser classificada em uni ou bidimensional. A eletroforese unidimensional separa as proteínas somente por massa molecular, e na eletroforese bidimensional as proteínas são separadas primeiramente por ponto isoelétrico (focalização isoelétrica – primeira dimensão) e posteriormente por massa molecular (segunda dimensão) (Sousa *et al.*, 2007). A técnica de espectrometria de massas permite a identificação de proteínas em pequenas concentrações, por seqüenciamento ou por características da estrutura e das propriedades químicas das moléculas (Mo & Karger, 2002; Villas-Bôas & Gombert, 2006).

Estudos com análises proteômicas de *M. anisopliae* auxiliam na compreensão de sua biologia e de suas interações com seus hospedeiros. Alguns trabalhos de análises proteômicas utilizam sobrenadante de cultivo de *M. anisopliae* na presença de cutícula de artrópodes a fim de mimetizar o processo de infecção e identificar proteínas envolvidas neste processo (Murad *et al.*, 2008; Santi *et al.*, 2009; Manalil *et al.*, 2010; Santi *et al.*, 2010). Nestes trabalhos utilizou-se espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF e as comparações de peptídeos foram realizadas com proteínas de *M. anisopliae* já depositadas em bancos de dados e principalmente com proteínas de outros organismos ortólogos, visto que o genoma de *M. anisopliae* foi publicado somente no início de 2011 (Gao *et al.*, 2011).

A maioria destas proteínas de sobrenadantes de cultivos possuem uma sequência de peptídeo-sinal na região amino-terminal (N-terminal), facilitando que as ferramentas de predição possam identificá-las. O peptídeo-sinal é uma sequência de aminoácidos que varia

entre 15 e 60 aminoácidos, e indica quais proteínas deverão ser exportadas para o ambiente extracelular para exercer suas funções, ou seja, é o sinal de exportação (secreção) das proteínas (von Heijne, 1990). Após a exportação, o peptídeo-sinal é removido por peptidases e a proteína torna-se madura (von Heijne, 1990).

Apesar dos trabalhos realizados com análises proteômicas de *M. anisopliae*, Gao *et al.* (2011) evidenciaram em seus sequenciamentos dos genomas de *Metarhizium* a existência de um grande número de proteínas secretadas para as espécies analisadas, sendo 1.865 proteínas secretadas e 30 quitinases para *M. anisopliae* (linhagem ARSEF 23) e 1.490 proteínas secretadas e 21 quitinases em *M. acridum*, evidenciando assim que existem muitas proteínas desconhecidas para o gênero *Metarhizium* que ainda não foram identificadas experimentalmente.

Neste trabalho utilizamos análises proteômicas para identificar proteínas secretadas diferencialmente expressas durante o cultivo do fungo em condições que mimetizam a interação com o hospedeiro e também para validar as quitinases propostas pela análise *in silico* do genoma de *M. anisopliae* (linhagem E6) (Junges, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo (i) identificar proteínas secretadas possivelmente envolvidas no processo de infecção do fungo *M. anisopliae* e (ii) validar as quitinases propostas pela análise *in silico* do genoma de *M. anisopliae*.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Padronizar as culturas de *M. anisopliae* em diferentes fontes de carbono;
- ✓ Identificar as proteínas secretadas de *M. anisopliae* por espectrometria de massas;
- ✓ Validar quitinases expressas por *M. anisopliae*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Linhagem utilizada, cultivo e manutenção de *M. anisopliae*

Nos experimentos foi utilizado *M. anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin linhagem E6, isolada de *Deios flavopicta* (Homoptera:Cercopidea), oriunda do Espírito Santo, cedida pelo Prof. João Lúcio de Azevedo da coleção da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP).

O cultivo e a manutenção do fungo foram realizados em meio de Cove (MC) (glicose 1%; nitrato de sódio 0,6%), acrescidos ainda de ágar 1,5% para meios sólidos. O pH do meio é ajustado para 6,5 e após a autoclavagem, foram adicionados 2% de solução de sais (KCl 2,6%; MgSO₄ 2,6%; KH₂PO₄ 7,6% (m/v)) e 0,04% de solução de elementos traços (Na₂B₄O₇ 0,004%; CuSO₄ 0,04%; FeSO₄ 0,001%; MgSO₄ 0,08% e ZnSO₄ 0,08% (m/v)), previamente preparadas e autoclavadas. As culturas foram incubadas em estufa a 28°C por sete dias.

4.1.2 Suspensão de esporos de *M. anisopliae*

Para preparação da suspensão de esporos de *M. anisopliae*, a linhagem E6 foi cultivada em placas de Petri contendo meio MC (descrito no item 4.1), repicada a partir de colônias estoque do fungo, por aproximadamente sete dias à 28°C.

Após o crescimento de sete dias, os esporos foram ressuspensos em solução estéril de Tween 80 0,01%, com auxílio de uma alça de Drigalski. A suspensão obtida foi centrifugada por 7 min a 7000 xg, lavada duas vezes com água destilada, sendo sempre centrifugada entre cada lavagem. Após a centrifugação os esporos foram ressuspensos em água estéril para uma concentração de aproximadamente 10⁸ esporos/mL (a contagem foi feita com auxílio de uma câmara de Neubauer), e testados quanto a sua esterilidade em

meio Luria-Bertani (LB: Bacto-Tryptona (Peptona) 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%).

4.1.3 Condições de cultivo para extração de proteínas

M. anisopliae foi cultivado frente a três substratos: (i) glicose (glicose 1%, nitrato de sódio 0,6%), (ii) quitina (quitina cristalina 0,8%, nitrato de sódio 0,6%) e (iii) GlcNAc (N-acetilglicosamina 0,25%, nitrato de sódio 0,6%). Após a esterilização em autoclave, foram adicionados 2% de solução de sais e 0,04% de solução de elementos traços (descritas no item 4.1). O inóculo foi de 10^6 esporos/mL e a incubação foi de 72 h e 96 h, com agitação de 200 xg, à temperatura de 28°C.

Os cultivos de *M. anisopliae* na presença de glicose e quitina foram incubados por 96 h, visto que a realização destes cultivos já havia sido realizada para o meu trabalho de conclusão de curso em 2008. Os cultivos de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc foram incubados por 72 h, pois os genes que codificam quitinases são mais expressos em menores tempos de cultivo (Da Silva *et al.*, 2005; Baratto *et al.*, 2006).

Após os cultivos, as culturas foram filtradas com papel filtro *Whatman* para obtenção dos sobrenadantes. Para concentrar as proteínas e remover os sais, os sobrenadantes foram liofilizados, suspensos em água Milli-Q estéril, dialisados (água destilada), liofilizados novamente, e armazenados no freezer à -20°C. Nos cultivos de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc, tanto os sobrenadantes como as porções miceliais (intracelulares) foram utilizadas para a análise de quitinases por zimogramas (descrito a seguir no item 4.1.8).

4.1.4 Quantificação das amostras de proteínas

Com as amostras de proteínas liofilizadas, coletou-se em um microtubo de 1,5 mL, o volume de 1 mL da amostra e adicionou-se 400 µL do tampão de inibidores de proteases (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0; PMSF 1 mM). Após a adição do tampão as amostras foram homogeneizadas no vortex e centrifugadas por 10 min a 10.000 xg, para a remoção novamente do sobrenadante.

A quantificação das amostras de proteínas foi obtida por fluorescência, utilizando kit *Quant-it Protein Assay* e o fluorímetro Qubit (*Invitrogen*); e a confirmação foi realizada por mini-géis de SDS-PAGE.

4.1.5 Eletroforese unidimensional (1-D)

Para os géis de eletroforese unidimensional (1-D), o volume de cada amostra foi correspondente à determinada quantidade de proteína podendo ser de 25 µg, 50 µg e 100 µg. As amostras de proteínas foram ressuspensas em tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM pH 6,8; SDS 4% (m/v); β-mercaptoetanol 400 mM; glicerol 40% (v/v); azul de bromofenol 0,02% (m/v)), e incubadas a 100°C por 3 min.

A solução de gel separador (*running*) utilizada nos géis 1-D foi de concentração 12,5% e a solução do gel concentrador (*stacking*) de 4%.

As amostras de proteínas foram aplicadas no gel, com os marcadores de proteínas LMW *calibration Kit* (baixo peso molecular - GE), HMW *calibration Kit* (alto peso molecular - GE), *BenchMark Protein Ladder (Invitrogen)* ou *Prestained SDS-PAGE standards low-range (Bio-Rad)*.

Logo após a eletroforese, a qual ocorreu em uma voltagem de 100 V, as proteínas foram coradas com Coomassie coloidal (Coomassie brilliant blue – G250 0,05% (m/v));

sulfato de amônio 10% (m/v); metanol 20% (v/v); ácido fosfórico 2%) *overnight*, seguido por lavagem em água destilada.

Os géis 1-D de amostras de sobrenadante de cultivos de *M. anisopliae* em presença de GlcNAc foram utilizados para identificação por espectrometria de massas. Nestes géis 1-D foram aplicados entre 100 µg (Figura 11C) à 300 µg (Figura 11A e B) de amostra proteínicas secretadas. Após a revelação dos géis 1-D de amostras de cultivos de GlcNAc, todas as regiões de proteínas coradas foram removidas e armazenadas a -20°C para posterior análise por MS.

4.1.6 Eletroforese bidimensional (2-D)

Para eletroforese bidimensional (2-D) as amostras de proteínas foram precipitadas utilizando ácido tricloroacético (TCA) 20% numa proporção de 1:1 (v/v) seguido de incubação a 4°C *overnight*. Após a incubação, as amostras de proteínas foram centrifugadas a 14.000 xg por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento, contendo as proteínas, foi lavado 3 vezes com acetona gelada, por centrifugação, a 12.000 xg por 3 min. Após as lavagens, as proteínas foram solubilizadas em tampão de solubilização (uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4%, DTT 1%, Anfólito 0,2%, Orange 0,001%) e ressuspendidas no vortex. Após 1 h à temperatura ambiente, centrifugou-se por 45 min, a 13.000 xg, em 20°C. A amostra foi distribuída uniformemente na tira de pH 3-10, 17 cm (*Bio-Rad*), para posterior isoeletrofocalização (IEF).

A IEF, primeira dimensão, iniciou com reidratação ativa a 250 V por 15 min a 20°C, seguido por 10.000 V por 3 h, e por 10.000 V até quase atingir uma taxa de 60.000 V/h. Posteriormente, as tiras foram equilibradas com 3 mL do tampão (uréia 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, tris 0,375 M pH 8,8 e azul de bromofenol 0,002%); primeiramente por 15 min contendo 1% de DTT, seguido por 15 min contendo 4% de iodoacetoamida. Após a IEF as tiras foram colocadas no gel de eletroforese 1-D (descrito no item 4.5.1) para a migração da segunda dimensão.

O programa *PDQuest 2-D Analysis Software (Bio-Rad)* foi utilizado para a determinação das massas moleculares e pontos isoelétrico.

Com a revelação dos perfis dos géis bidimensionais, os *spots* de interesse foram coletados e armazenados a -20°C para posterior análise por espectrometria de massas.

Os géis 2-D de amostras de sobrenadante de cultivos de *M. anisopliae* em presença de glicose e quitina foram utilizados para identificação por espectrometria de massas. Nestes géis 2-D foram aplicados entre 1,5 mg (Figura 8A, B, D, E) à 2 mg (Figura 8C e F) de amostra proteínas secretadas. Após a revelação dos géis 2-D, os *spots* foram analisados no programa *PDQuest 2-D Analysis Software (Bio-Rad)* o qual possibilitou a determinação das massas moleculares e pontos isoelétrico. Este programa também permitiu comparar as condições testadas e verificar os *spots* diferencialmente expressos entre as condições, os quais serão identificados por MS.

Os *spots* selecionados foram coletados e armazenados a -20°C para posterior análise por espectrometria de massas.

4.1.7 Atividade enzimática de quitinase

Para determinar a atividade enzimática de quitinase, utilizou-se o substrato 4-methylumbelliferyl-b-D-N-triacetyl-chitotrioside (4-MU-[GlcNAc]₃), com o qual detecta-se atividade de endo e exoquitinase. O ensaio foi realizado em microplacas com 0,8 mM do substrato, 0,1 M do tampão citrato-fosfato pH 5,0 (0,1 M ácido cítrico; 0,1 M fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄)), e 20 µL da amostra de proteínas (Selvaggini *et al.*, 2004). Este foi incubado a 37°C por 30 min. Após a incubação, a reação foi parada com a adição de 1 M do tampão glicina-NaOH pH 10,6. Incubado por 5 min a 37°C, e então realizada a leitura da fluorescência, em espectrofotômetro de microplacas. A atividade enzimática foi mensurada somente no cultivo de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc, visto que os cultivos de *M. anisopliae* na presença de quitina e glicose haviam sido finalizados no trabalho de conclusão de curso em 2008.

4.1.8 Análise de quitinases por zimogramas

No zimograma de quitinases as amostras de proteínas foram ressuspensas em tampão de amostra (tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 4% (m/v); glicerol 60% (v/v); azul de bromofenol 0,005% (m/v)), e incubadas a 100°C por 2 min.

A solução de gel separador (*running*) utilizada nos zimogramas de quitinases foi de concentração 12,5% com a adição de 1% do substrato glicol-quitina, e a solução do gel concentrador (*stacking*) foi de concentração 4%.

Nos géis foram aplicados também quitinases purificadas de *Streptomyces griseus* como marcador de quitinases (*Sigma*), utilizadas como padrões de atividade quitinolítica e de massa molecular (kDa).

Após a migração, o gel foi incubado por 15 h em tampão acetato de sódio (acetato de sódio 3M pH 5,2, Triton X-100 1%), sob leve agitação a 30°C. Ao final da incubação, o gel foi lavado com água destilada e corado com tampão de coloração (tris-HCl 2 M pH 8,9, Calcofluor White 0,005%), por 5 min com agitação, descorando o gel com sucessivas lavagens de água destilada.

Com o gel descorado, através de um transiluminador de luz UV foi possível observar regiões de lise onde o substrato glicol-quitina foi degradado.

Para o zimograma de quitinases somente cultivo de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc foi utilizado, visto que os cultivos de *M. anisopliae* na presença de quitina e glicose haviam sido finalizados no trabalho de conclusão de curso em 2008. Nos zimogramas foram aplicados de 50 µg à 100 µg de proteínas de sobrenadante e de micélio de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc.

4.1.9 Preparação de amostras para análise por espectrometria de massas

Os *spots* e as regiões de interesse, armazenados em microtubos a -20°C utilizam abordagens diferentes uni e bidimensional, por esta razão receberam tratamento diferentes para posterior análise por espectrometria de massas.

Nos microtubos que continham os *spots*, foram adicionados $400\ \mu\text{L}$ de acetonitrila 50% em 25 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0, por 15 min, este procedimento foi repetido cinco vezes afim de descolorir o gel. Após as lavagens foi acrescentado acetonitrila 100% por 5 min, e posterior secagem no concentrador *SpeedVac*. Os géis foram reidratados com solução de tripsina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tripsina (Promega) em 25 mM bicarbonato de amônio, pH 8,0), e incubados por 24 h a 37°C . Após a digestão com tripsina, foi adicionado uma solução de acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 5% (TFA), por duas vezes, extraíndo o sobrenadante a cada 1 h. Para finalizar os extratos foram secos no concentrador *SpeedVac* e armazenados a -80°C . O protocolo referente a extração dos peptídeos a partir de *spots* foi retirado do protocolo de tripsinização da Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massas do CBIot ([http://www.uniprote-
ms.ufrgs.br](http://www.uniprote-
ms.ufrgs.br)).

O protocolo referente a extração dos peptídeos a partir de regiões de gel já havia sido estabelecido (Shevchenko *et al.*, 1996). As regiões de gel ficaram embebidas em uma solução que continha metanol 50% e ácido acético 5%, *overnight* a temperatura ambiente. A seguir, os microtubos foram centrifugados para descartar a solução. As regiões foram então desidratadas com acetonitrila 100%, por 5 min, centrifugadas para descarte da solução e secadas em *SpeedVac* para completa remoção dos resíduos de acetonitrila. Após a secagem, se tratando de gel unidimensional, as regiões foram reduzidas com 10 mM DTT, e depois alcalinizadas com 50 mM iodocetamida, ambas soluções por 30 min a temperatura ambiente, com centrifugações de 10.000 $\times g$ entre elas. Depois deste processo, as regiões foram lavadas com 25 mM de bicarbonato de amônio, por 10 min. Após esta lavagem, as regiões receberam o mesmo tratamento descrito anteriormente para os *spots*.

4.2.0 Análise de proteínas por Espectrometria de Massas (MS)

Os *spots* e as regiões foram ressuspensos em 0,1% ácido fórmico para análise por espectrometria de massas utilizando a Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massa do CBIot (www.uniprote-ms.ufrgs.br). Utilizando o espectrômetro de massas Micro-Q-ToF (Micromass), com sistema de *nanoAcquity* acoplado, ionização por *electrospray* (ESI), tempo-de-vôo quadrupolo (Q-TOF), modo MS/MS.

Os espectros de MS foram processados e os arquivos gerados foram utilizados para realizar buscas em bancos de dados através do *software* MASCOT (*Matrix Science*; <http://www.matrixscience.com>). Nas comparações foram utilizados dois bancos de dados: (i) o banco de dados local de proteínas de *M. anisopliae* (linhagem E6), gerado a partir da plataforma do SABIA (*System for Automated Bacterial Integrated Annotation*) (Almeida *et al.*, 2004); e (ii) o banco de dados não-redundante do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/NCBI/nr>). As análises foram realizadas com os seguintes parâmetros: enzima tripsina (cliva nos aminoácidos Lisina ou Arginina); máximo duas clivagens perdidas; carbamidometilação na cisteína como modificação fixa; modificações variáveis oxidação na metionina; N° tolerância de peptídeo ± 1.2 Da e N° tolerância MS/MS ± 0.6 Da. Os resultados obtidos foram avaliados quanto: a repetição da identificação entre as triplicatas; massa (kDa) e pI teóricos próximos ao observado, porcentagem de cobertura do aminoácidos e valor do *score* do MASCOT.

4.2.1 Análise dos resultados de MS

As proteínas identificadas foram analisadas e caracterizadas em programas de bioinformática. Massa molecular e pI teóricos foram calculados usando a ferramenta *pI/Mw* (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html). Para a predição do sítio de clivagem do peptídeo-sinal utilizou-se a ferramenta *SignalP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). O ancoramento de GPI (glicosilfosfatidilinositol) foi predito utilizando a ferramenta *big-PI Fungal Predictor* (http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html). Os íntrons foram

preditos utilizando a ferramenta *FGENESH* (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>). Os domínios conservados foram analisados utilizando o *InterProScan* (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>). O banco de dados para análise das famílias de proteínas utilizado foi o *PFAM* (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) e para as superfamílias foi utilizado o *SUPERFAMILY* (<http://supfam.org/SUPERFAMILY/>). Para comparação com as sequências de outras proteínas utilizou-se os bancos de dados do *UniProt* (Swiss-Prot e TrEMBL: <http://www.uniprot.org/>) e *NCBI* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A ferramenta *TCDB* (<http://www.tcdb.org/>) foi utilizada para a identificação de proteínas transportadoras. As proteínas identificadas também foram classificadas por categorias funcionais através de comparações com o banco de dados do *Gene Ontology* (CO) utilizando o software *Blast2GO* (<http://www.blast2go.org/>). Para a caracterização das peptidases foi utilizado o banco de dados *MEROPS* (<http://merops.sanger.ac.uk>).

5. RESULTADOS

No presente estudo, foram analisadas proteínas secretadas pelo fungo *M. anisopliae* em culturas na presença de três diferentes substratos, procurando identificar aquelas com possibilidade de participação no processo de infecção do fungo e validar experimentalmente quitinases propostas pela análise *in silico*. Utilizamos o fracionamento por eletroforese uni e bidimensional e identificação das proteínas por espectrometria de massas.

5.1 Cultivos de *M. anisopliae* na presença de diferentes fontes de carbono

M. anisopliae (linhagem E6) foi cultivado na presença de três diferentes substratos: (i) glicose 1% (glicose), fonte de carbono basal de fácil assimilação, que atua como repressor catabólico (Bogo *et al.*, 1998; Screen *et al.*, 2001; Krieger *et al.*, 2003); (ii) quitina cristalina 0,8% (quitina), fonte de carbono e nitrogênio que mimetiza o componente principal da cutícula dos artrópodes e as condições de infecção, pode atuar como indutor de quitinases (da Silva *et al.*, 2005; Baratto *et al.*, 2006) e (iii) N-acetilglicosamina 0,25% (GlcNAc), que em baixas concentrações induz o sistema quitinolítico (Krieger *et al.*, 2003; da Silva *et al.*, 2005; Baratto *et al.*, 2006). Estes cultivos foram realizados em meio líquido com incubação de 72 h e 96 h, à temperatura de 28°C. A Figura 7 ilustra as características morfológicas da colônia de *M. anisopliae* cultivado por 10 dias, à 28°C, na presença dos três substratos: glicose, quitina e GlcNAc.

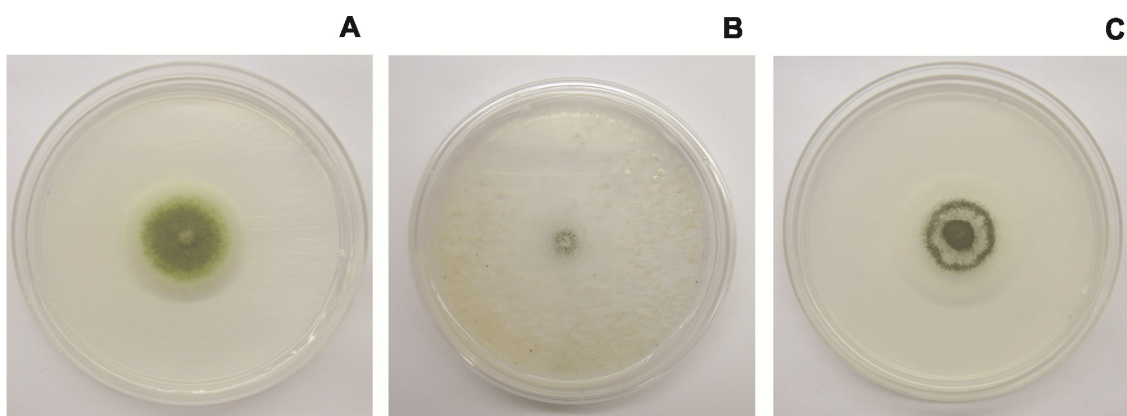


Figura 7. Características morfológicas da colônia de *M. anisopliae* (linhagem E6). Cultivo de *M. anisopliae* em meio sólido na presença de diferentes fontes de carbono, por 10 dias à 28°C. **A:** *M. anisopliae* em meio com glicose 1%. **B:** *M. anisopliae* em meio com quitina cristalina 0,8%. **C:** *M. anisopliae* em meio com GlcNAc 0,25%.

5.2 Identificação das proteínas secretadas de culturas de *M. anisopliae*

Após os cultivos de *M. anisopliae* na presença de três diferentes substratos (glicose, quitina e GlcNAc), as proteínas de sobrenadantes de cultura foram extraídas para as análises de eletroforese uni e bidimensional.

As proteínas secretadas dos cultivos de 96 h de *M. anisopliae* na presença de glicose 1% e de quitina cristalina 0,8% foram analisadas e comparadas através da eletroforese bidimensional (2-D). Estes cultivos foram utilizados com o objetivo de analisar condições que mimetizam a infecção do fungo *M. anisopliae*. Após a eletroforese bidimensional, os géis 2-D foram corados com *Coomassie coloidal*, permitindo a visualização dos *spots*. Os géis 2-D destas amostras de proteínas secretadas foram realizados em triplicatas e revelaram padrões diferentes entre estes dois substratos testados (glicose e quitina), permitindo o início das análises comparativas (Figura 8).

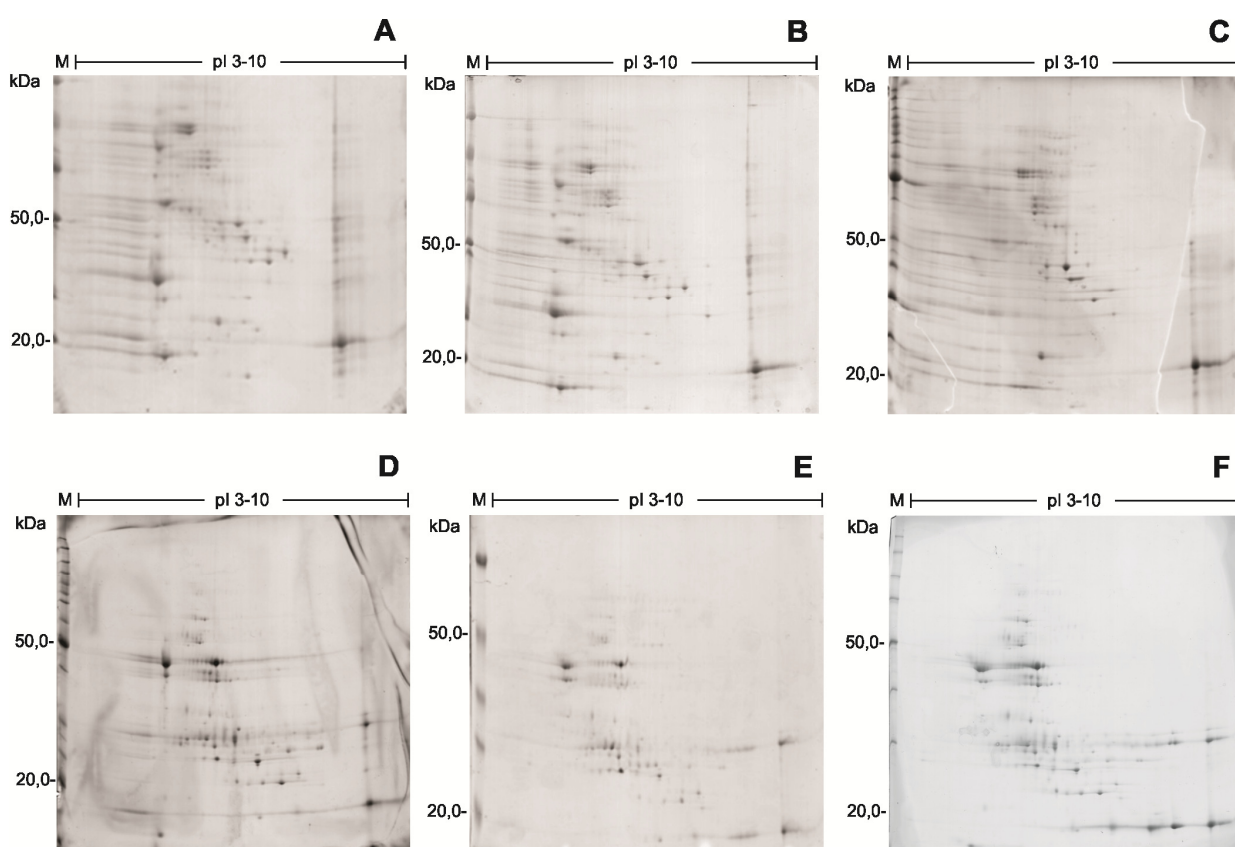


Figura 8. Comparação entre as triplicatas dos perfis eletroforéticos 2-D de extratos protéicos de *M. anisopliae* cultivado por 96 h em meio suplementado com diferentes fontes de carbono. Nos géis 2-D foram aplicados entre 1,5 mg à 2 mg de proteínas secretadas. **M.** Marcador de massa molecular (kDa). **Painéis A, B e C.** Proteínas do sobrenadante de cultura de *M. anisopliae* na presença de glicose 1%. **Painéis D, E e F.** Proteínas do sobrenadante de cultura de *M. anisopliae* na presença de quitina cristalina 0,8%.

A análise dos géis 2-D foi realizada através do programa *PDQuest 2-D Analysis Software*, com o qual é possível comparar os pI's (pontos isoelétricos) e as massas moleculares (kDa) dos *spots* presentes nos diferentes géis 2-D analisados. Esta ferramenta permitiu analisar o padrão dos géis 2-D entre as duas condições testadas (glicose e quitina), possibilitando verificar a presença de *spots* diferencialmente expressos entre as condições.

Através desta análise no programa *PDQuest 2-D Analysis Software*, os *spots* que se apresentaram diferencialmente expressos entre as duas condições (glicose e quitina) foram

selecionados para identificação por MS, sendo: (i) 9 *spots* (G1-G9) selecionados da condição de cultivo *M. anisopliae* na presença de glicose, com massas moleculares observadas variando entre 44,0 kDa e 18,0 kDa, e pI's de 4,9 à 5,7; e (ii) 7 *spots* (Q1-Q7) selecionados da condição de cultivo *M. anisopliae* na presença de quitina, com massas moleculares observadas entre 42,5 kDa e 26,5 kDa e pI's de 4,9 à 5,9 (Figura 9). Estes *spots* representaram melhor reprodutibilidade entre as triplicatas dos géis 2-D dos sobrenadantes de cultura de *M. anisopliae* na presença de glicose e de quitina.

Os 16 *spots* selecionados dos géis 2-D foram excisados dos géis 2-D, digeridos com tripsina e submetidos a identificação por MS. Os espectros de MS gerados, a partir destes *spots* selecionados, foram comparados com seqüências de aminoácidos depositadas em bancos de dados, possibilitando a identificação de 14 proteínas de *M. anisopliae* (Tabela 3 e 4). Estes géis 2-D de *M. anisopliae* na presença de quitina e glicose haviam sido realizados para meu trabalho de conclusão de curso em 2008, porém somente nesta dissertação foi possível realizar comparações com banco de dados de *M. anisopliae*.

Além dos substratos glicose e quitina cristalina, *M. anisopliae* também foi cultivado na presença de GlcNAc 0,25%. Os cultivos de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc foram de 72 h, pois os genes que codificam quitinases são mais expressos em menores tempos de cultivo (Da Silva *et al.*, 2005; Baratto *et al.*, 2006), e o objetivo deste cultivo é validar experimentalmente as quitinases propostas pela análise *in silico* do genoma de *M. anisopliae*. Após este cultivo, as proteínas dos sobrenadantes e dos micélios foram quantificadas através de ensaios para detecção de atividade quitinolítica, com o objetivo de quantificar a atividade quitinolítica (endo e/ou exoquitinase) que estava presente neste cultivo. O ensaio com as amostras de proteínas de sobrenadante e de micélio de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc foi realizado utilizando como substrato o oligômero 4-MU-[GlcNAc]₃ (Tabela 2). Os ensaios foram realizados em triplicata e observa-se que os valores apresentam grande variação entre as réplicas, não permitindo detectar diferenças entre as amostras das duas condições, sendo necessário realizar outros ensaios para definições conclusivas.

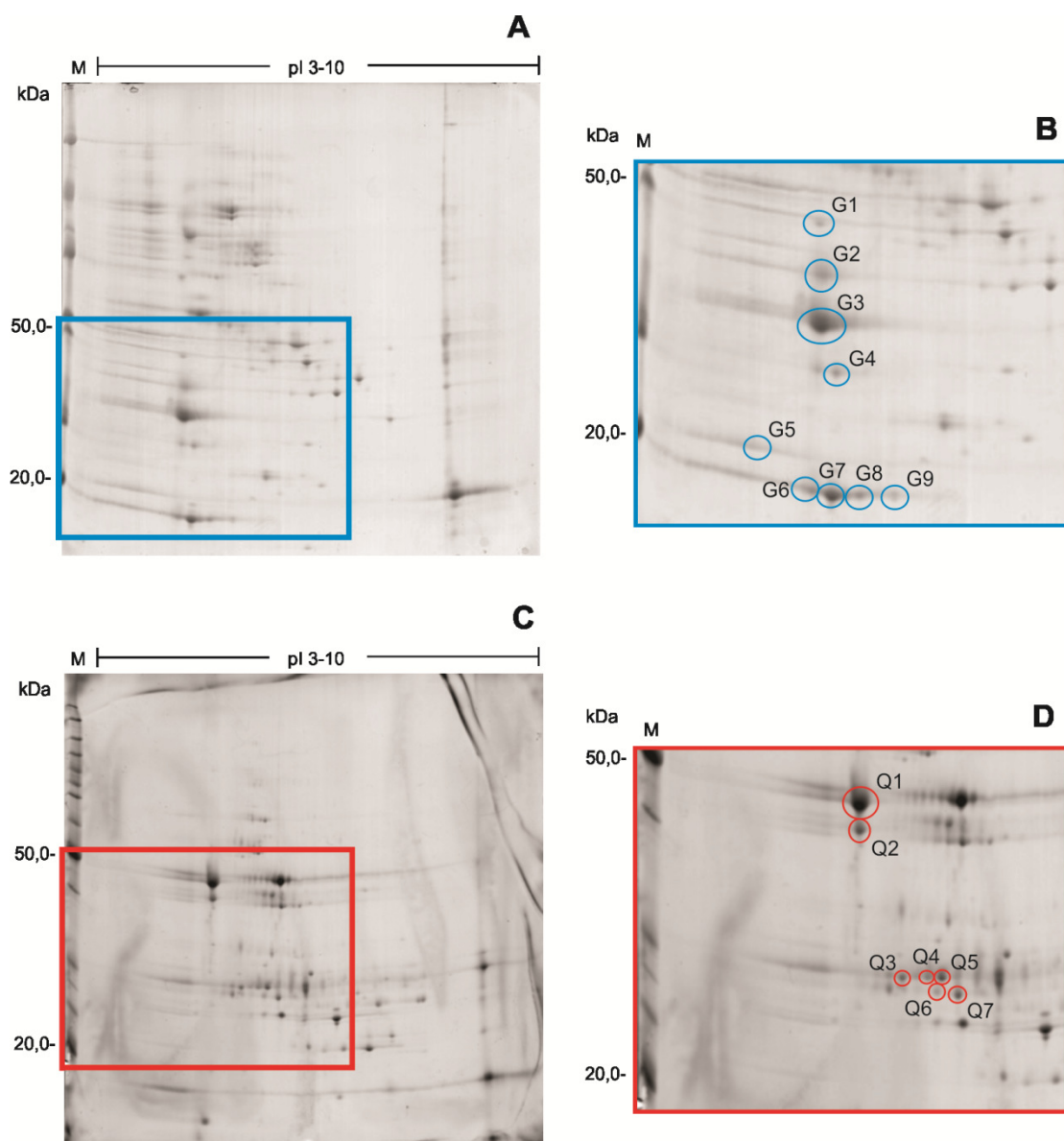


Figura 9. Perfil eletroforético 2-D das proteínas secretadas por *M. anisopliae* cultivado por 96 h na presença de diferentes fontes de carbono. Os spots marcados nas figuras foram selecionados para identificação por espectrometria de massas. M: Marcador de massa molecular (kDa). A: Proteínas de sobrenadante de cultura de *M. anisopliae* na presença de glicose. B: Ampliação da região do gel dos 9 spots selecionados para identificação do cultivo de *M. anisopliae* na presença de glicose. C: Proteínas de sobrenadante de cultura de *M. anisopliae* na presença de quitina. D: Ampliação da região do gel dos 7 spots selecionados para a identificação do cultivo de *M. anisopliae* na presença de quitina.

As amostras de proteínas de sobrenadante e de micélio de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc também foram analisadas em zimograma de quitinases. Nos géis de zimogramas de quitinases, o substrato glicol-quitina 1% (derivado solúvel da quitina) foi utilizado para a detecção de possíveis quitinases. Junto com as amostras de proteínas também foi aplicado quitinases purificadas de *S. griseus* como controle. As quitinases purificadas de *S. griseus* possuem massas moleculares já estabelecidas, por esta razão em zimogramas de quitinases são utilizadas como marcadores para atividade quitinolítica e massas moleculares (kDa). Após a revelação dos zimogramas com a luz UV observou-se regiões de degradação do substrato glicol-quitina, evidenciando uma maior degradação deste substrato nas amostras de proteínas de sobrenadante de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc, evidenciando que provavelmente esta condição expressa maior atividade e/ou concentração de quitinases (Figura 10).

Tabela 2. Ensaio de atividade de quitinase com o substrato 4-MU-[GlcNAc]₃ em amostras de proteínas de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc 0,25%.

| Amostras de proteínas | Atividade de Quitinase (U)* | |
|---------------------------|-----------------------------|--------|
| Sobrenadante ^a | GlcNAc A | 596,19 |
| | GlcNAc B | 227,50 |
| | GlcNAc C | 971,51 |
| Micélio ^b | GlcNAc A | 323,26 |
| | GlcNAc B | 994,71 |
| | GlcNAc C | 966,75 |

*Atividade de Quitinase representada por pmol/mL/min.

^a Proteínas do sobrenadante de cultura de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc 0,25%.

^b Proteínas do micélio do cultivo de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc 0,25%.

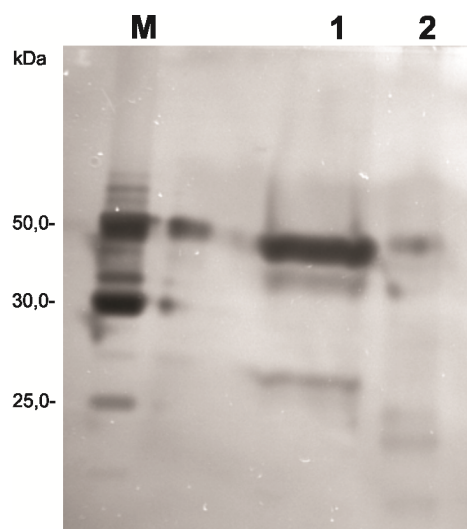


Figura 10. Análise de zimogramas de quitinasases das amostras de proteínas de culturas de 72 h de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc 0,25%. **M:** Quitinasases purificadas de *S. griseus* utilizadas como padrões de atividade quitinolítica e de massa molecular (kDa). **1:** Proteínas de sobrenadante do cultivo de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc. **2:** Proteínas de micélio do cultivo de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc.

As proteínas de sobrenadantes dos cultivos de 72 h de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc 0,25% foram também analisadas através de eletroforese unidimensional (1-D), com o objetivo de validar experimentalmente as quitinasases propostas pela análise *in silico* do genoma de *M. anisopliae* (linhagem E6) visto que esta fonte de carbono em baixas concentrações induz o sistema quitinolítico. Após a migração das amostras de proteínas, os géis 1-D foram corados com *Coomassie coloidal* para a visualização das regiões de proteínas presentes nos géis. Os géis 1-D das amostras de proteínas secretadas de *M. anisopliae* em presença de GlcNAc, foram realizados em triplicatas biológicas para análise e comparação das regiões (Figura 11).

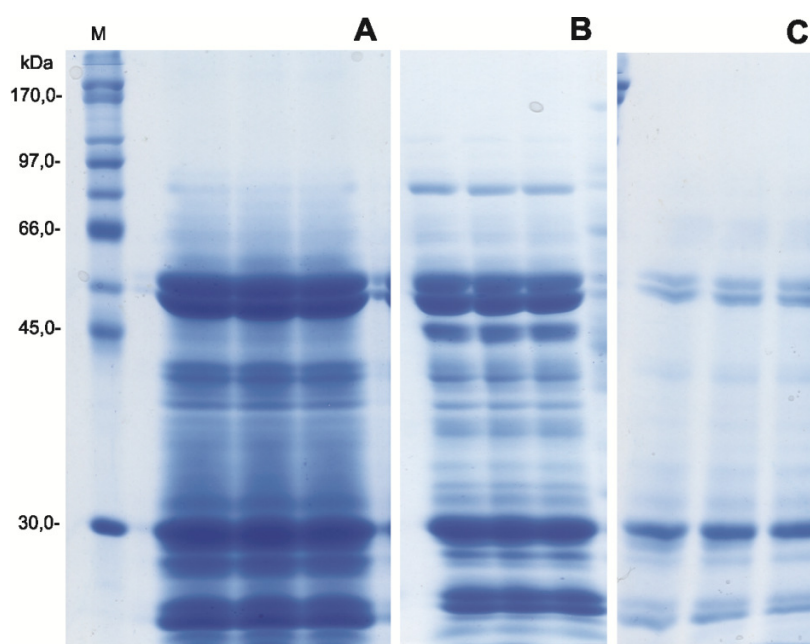


Figura 11. Comparação entre as triplicatas dos perfis eletroforéticos 1-D de extratos protéicos de *M. anisopliae* cultivado por 72 h em meio suplementado com GlcNAc 0,25%. Nos géis 1-D foram aplicados entre 100 µg à 300 µg de proteínas secretadas. M. Marcador de massa molecular (kDa). Painéis A, B e C. Géis 1-D de proteínas do sobrenadante de culturas de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc.

Os padrões eletroforéticos entre as amostras de proteínas de sobrenadante de cultivo de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc foram comparados e analisados visualmente (Figura 11). Como o objetivo era identificar quitinases, todas as regiões das amostras de proteínas coradas (32 regiões), com *Coomassie coloidal*, foram excisadas dos géis 1-D, digeridas com tripsina e submetidas à identificação por MS. Porém, somente 17 regiões (N1 à N17), com massas moleculares observadas variando entre 50,0 kDa a 20,0 kDa, obtiveram a identificação dos espectros gerados por MS (Figura 12). Através de comparações com os espectros gerados por MS e bancos de dados com seqüências de aminoácidos foi possível identificar 30 proteínas de *M. anisopliae* (Tabela 5).

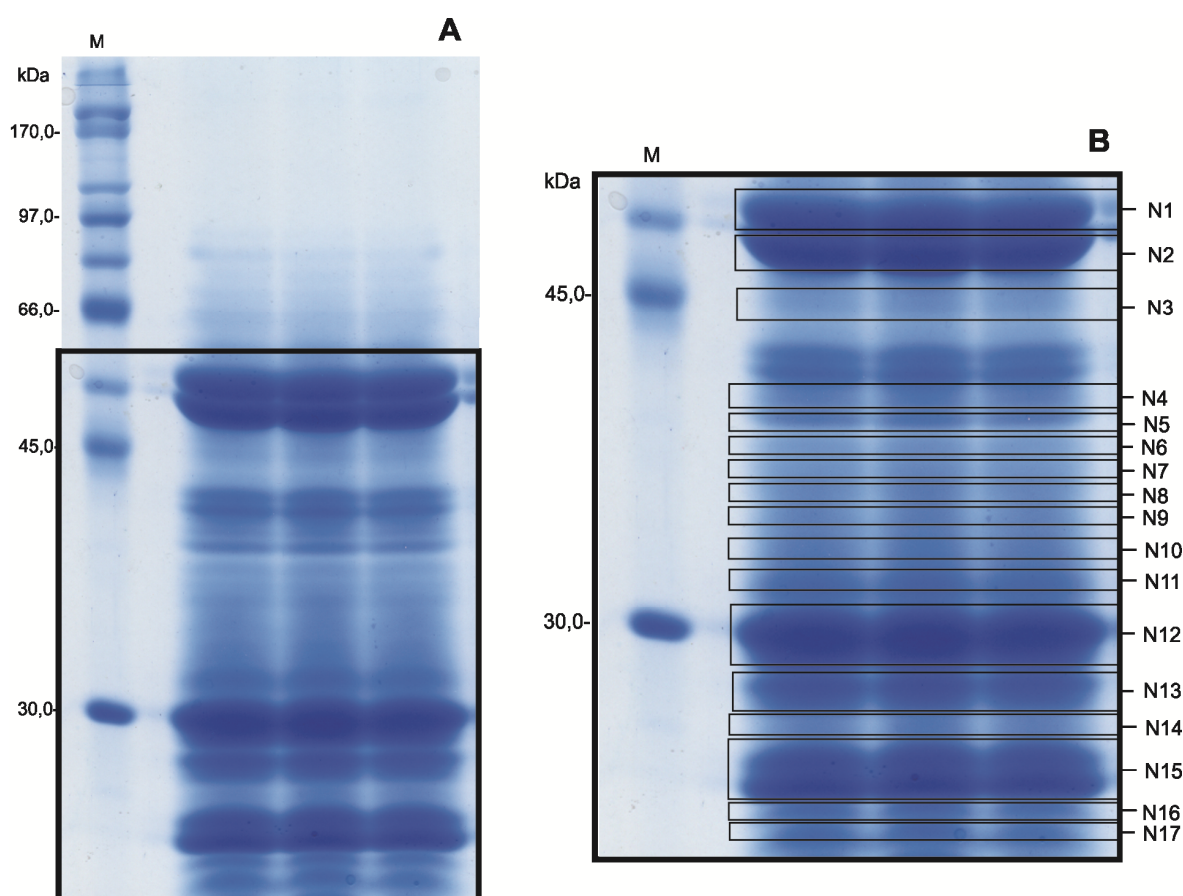


Figura 12. Perfil eletroforético 1-D das proteínas secretadas por *M. anisopliae* cultivado por 72 h na presença de GlcNAc 0,25%. Os retângulos marcados no gel 1-D evidenciam as regiões de separação de proteínas identificadas por espectrometria de massas. **M:** Marcador de massa molecular (kDa). **A:** Proteínas de sobrenadante de cultura de *M. anisopliae* na presença GlcNAc. **B:** Proteínas de sobrenadante de cultura de *M. anisopliae* na presença GlcNAc, com ampliação nas 17 regiões identificadas por espectrometria de massas.

Nos experimentos de eletroforese uni e bidimensional foram realizadas três réplicas biológicas e uma replicata técnica para cada amostra de proteína de sobrenadante de cultura de *M. anisopliae* na presença dos diferentes substratos (glicose, quitina e GlcNAc).

Para as identificações das proteínas (Tabelas 3, 4 e 5), os resultados obtidos foram analisados e avaliados quanto à repetição da identificação entre as triplicatas dos géis 1-D e 2-D, sendo no mínimo duas identificações da mesma proteína entre as triplicatas do mesmo tipo de cultivo, os valores de massas moleculares (kDa) e pI's (ponto isoeletrico) teóricos

da proteína identificada próximos aos valores observados, a porcentagem de cobertura dos aminoácidos na proteína dita identificada; e o valor do *score* (íons *score*) gerado a partir do *software* MASCOT. Os espectros gerados por MS que identificaram proteínas que não compreendem estes critérios estão presentes no Anexo 1.

Tabela 3. Resultados da identificação por espectrometria de massas de proteínas de sobrenadantes de cultivos de *M. anisopliae* na presença de glicose. G1-G9: Spots de proteínas secretadas de cultivos de *M. anisopliae* na presença de glicose. O pI e a massa molecular (kDa) observada e teórica possuem a presença da região de peptídeo-sinal.

| Spots | Proteínas identificadas ^a | Nº acesso ^b | pI/massa (kDa) | | Score MASCOT ^c | Cobertura | Peptídeo identificado |
|-----------|--|------------------------|----------------|------------|---------------------------|-----------|---|
| | | | observada | teórica | | | |
| G1 | Glicosil hidrolase ^(B,18) (GH76 α -1,6-mananases) | MA06844 | 4,90/44,00 | 5,23/43,36 | 155 | 26% | QYVNAIANELYLSVAASLAR DIAVQQWDFERSGMINAQNLINDGLDGSK AVSIAQAAMKTLVNGILTETGGCDAAGDCGR YLNDVAPHQEFKDFIINAK |
| G2 | Hipotética conservada (Q,3) | MA03234 | 4,90/40,00 | 4,61/20,49 | 52 | 25% | CVQPESGDPATFSFSWPEK FWAQGGSK TISCNHINAPVPIEAMQAVA |
| G3 | Hipotética conservada (Q,3) | MA03234 | 4,90/34,00 | 4,61/20,49 | 143 | 25% | CVQPESGDPATFSFSWPEK FWAQGGSK TISCNHINAPVPIEAMQAVA |
| G4 | DNase 1 ^(Q,18) | MA06273 | 5,10/28,00 | 4,90/17,69 | 157 | 43% | VRTIYFTPNGFPEVAPVTCNNK TVVNFPDQWIGNYYAVQK QMYPASGKSPMSGCPVPCNNAYYLPDDVQTK |
| G5 | Hipotética conservada (P,1) | MA10386 | 4,50/20,00 | 9,24/18,92 | 113 | 28% | GNLPDLNALQSK VGSDHDSVGLFQQRASIKDKVK SAYPDRYNKFVPTATK |
| G6 | SnodProt1 ^(Q,3,8) | MA10328 | 4,90/18,00 | 5,16/14,21 | 117 | 24% | SLTDVSCSDGK LDYEGMSIK AVEFGQVDATATR |
| G7 | SnodProt1 ^(Q,3,8) | MA10328 | 5,10/17,00 | 5,16/14,21 | 109 | 42% | SLTDVSCSDGK LDYEGMSIKVLAIHDHAGNGFNIGQTAMNALTNGRAVEFGQVDATATR |
| G8 | SnodProt1 ^(Q,3,8) | MA10328 | 5,50/18,00 | 5,16/14,21 | 96 | 36% | VSWDSGYDR SLTDVSCSDGK LDYEGMSIK AVEFGQVDATATRLTPGDCGL |

Tabela 3. (continuação)

| <i>Spots</i> | Proteínas identificadas ^a | Nº acesso ^b | pl/massa (kDa) observada | pl/massa (kDa) teórica | Score MASCOT ^c | Cobertura | Peptídeo identificado |
|--------------|---|------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|-----------|---|
| G8 | Hipotética conservada ^(Q,18) | MA08606 | 5,50/18,00 | 5,47/39,83 | 34 | 9% | VATETGQPAAVGELLTVGSVPKSSEFPGPVMIITGDR |
| G9 | SnodProt1 ^(Q,3,8) | MA10328 | 5,70/18,00 | 5,16/14,21 | 104 | 24% | SLTDVSCSDGK LDYEGMSIK AVEFGQVDATATR |
| | Hipotética conservada ^(Q,18) | MA08606 | 5,70/18,00 | 5,47/39,83 | 101 | 9% | VATETGQPAAVGELLTVGSVPKSSEFPGPVMIITGDR |

^aProteína identificada de acordo com o banco de dados SABIA (Almeida *et al.*, 2004).

^bNúmero de acesso do banco de dados SABIA (Almeida *et al.*, 2004).

^cScore do MASCOT: Íons *score*- 10*Log(P) – onde P é a probabilidade do *match* não ser um evento aleatório.

Categorização funcional das proteínas identificadas baseado no banco de dados do *Gene Ontology (GO)*. **Categorização Molecular:** (A) Ligação entre cátion; (B) Atividade de hidrolase; (C) Atividade do tipo serino-endopeptidase; (D) Atividade de quitinase; (E) Atividade catalítica; (F) Ligação à carboidrato; (G) Atividade de lisozima; (H) Idêntica à proteína de ligação; (I) Atividade de peptidase; (J) Atividade de beta-N-acetilhexosaminidase; (K) Atividade metalocarboxipeptidase; (L) Ligação ao íon zinco; (M) Atividade de isomerase; (N) Atividade de carbono-nitrogênio ligases; (O) Atividade de transferase; (P) Atividade de metaloendopeptidase e (Q) Proteínas que não possuem classificação molecular no *GO*. **Categorização Biológica:** (1) Proteólise; (2) Processo metabólico dos carboidratos; (3) Interação com o hospedeiro via proteínas secretadas pelo sistema de secreção do tipo II; (4) Regulação negativa da atividade catalítica; (5) Maturação; (6) Processo catabólico de macromoléculas da parede celular; (7) Processo catabólico do peptideoglicano; (8) Patogênese; (9) Processo metabólico; (10) Processo catabólico da quitina; (11) Processo metabólico da hexose; (12) Resposta de defesa a bactéria; (13) Citólise; (14) Desenvolvimento micelial; (15) Resposta ao cAMP; (16) Regulação da transcrição, dependente de DNA; (17) Transdução de sinal e (18) Proteínas que não possuem classificação biológica no *GO*.

Tabela 4. Resultados da identificação por espectrometria de massas de proteínas de sobrenadantes de cultivos de *M. anisopliae* na presença de quitina. Q1-Q7: Spots de proteínas secretadas de cultivos de *M. anisopliae* na presença de quitina. O pI e a massa molecular (kDa) observada e teórica possuem a presença da região de peptídeo-sinal.

| <i>Spots</i> | Proteínas identificadas ^a | Nº acesso ^b | pI/massa (kDa) observada | pI/massa (kDa) teórica | Score MASCOT ^c | Cobertura | Peptídeo identificado |
|--------------|---|------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|-----------|--|
| Q1 | Homóloga à Aorsina ^(C,1) | MA02966 | 4,90/42,50 | 5,00/65,77 | 398 | 11% | QRNLDKGMDSPPSSK QTDLDFYR QCDEFMK IPSDGGIYNR TGGTSM SAPIVAAIFTR KPIGFANPALYK |
| Q2 | Homóloga à Tripeptidil-peptidase 1 ^(I,18) | MA01092 | 4,90/41,00 | 4,70/57,86 | 80 | 4% | MGIAGFIGQFASKSDLATFMSK |
| Q3 | Protease semelhante à tripsina ^(C,1) (<i>try1</i>) | MA09286 | 5,50/28,00 | 4,93/26,31 | 144 | 11% | YEGLGVDMAILK VTPVVDR LGADIEFIK |
| Q4 | Quitinase CHIT30 (<i>chi3</i>) [chiMaB2] ^(A,D,2) | MA02097 | 5,70/28,00 | 5,24/34,14 | 147 | 15% | MSIGNLGGPSR AGATGLQDGSSLVK ELRPFQDVKLDGVLDNETNDGTGYLAMTK |
| Q5 | Quitinase CHIT30 (<i>chi3</i>) [chiMaB2] ^(A,D,2) | MA02097 | 5,80/28,00 | 5,24/34,14 | 231 | 15% | MSIGNLGGPSR AGATGLQDGSSLVK ELRPFQDVKLDGVLDNETNDGTGYLAMTK |
| Q6 | Protease do tipo subtilisina Pr1D ^(C,H,1,4) | MA09188 | 5,80/26,50 | 5,93/42,71 | 102 | 16% | DISGHGTHVAGTVGGVTFGVAK SVINQSLGGPFSR GVLSVIAAGNAQRDASEVSPASAPNAVTVGAVDR |
| Q6 | Protease tripsina ^(C,1) | MA02007 | 5,80/26,50 | 6,59/36,48 | 45 | 7% | LATDIPESATIK LQEGGATPSQLQK |
| Q7 | Hipotética conservada ^(Q,18) | MA05109 | 5,80/26,50 | 5,34/50,16 | 28 | 1% | HEDLGSQTR |
| | Hipotética conservada ^(E,F,2) | MA05177 | 5,90/26,50 | 5,35/25,82 | 54 | 10% | TVPDLKPFPR ASFHITPYFGNVK |

^aProteína identificada de acordo com o banco de dados SABIA (Almeida *et al.*, 2004).

^bNúmero de acesso do banco de dados SABIA (Almeida *et al.*, 2004).

^cScore do MASCOT: Íons *score*- 10*Log(P) – onde P é a probabilidade do *match* não ser um evento aleatório.

Categorização funcional das proteínas identificadas baseado no banco de dados do *Gene Ontology (GO)*. **Categorização Molecular:** (A) Ligação entre cátion; (B) Atividade de hidrolase; (C) Atividade do tipo serino-endopeptidase; (D) Atividade de quitinase; (E) Atividade catalítica; (F) Ligação à carboidrato; (G) Atividade de lisozima; (H) Idêntica à proteína de ligação; (I) Atividade de peptidase; (J) Atividade de beta-N-acetilhexosaminidase; (K) Atividade metalocarboxipeptidase; (L) Ligação ao íon zinco; (M) Atividade de isomerase; (N) Atividade de carbono-nitrogênio ligases; (O) Atividade de transferase; (P) Atividade de metaloendopeptidase e (Q) Proteínas que não possuem classificação molecular no *GO*. **Categorização Biológica:** (1) Proteólise; (2) Processo metabólico dos carboidratos; (3) Interação com o hospedeiro via proteínas secretadas pelo sistema de secreção do tipo II; (4) Regulação negativa da atividade catalítica; (5) Maturação; (6) Processo catabólico de macromoléculas da parede celular; (7) Processo catabólico do peptideoglicano; (8) Patogênese; (9) Processo metabólico; (10) Processo catabólico da quitina; (11) Processo metabólico da hexose; (12) Resposta de defesa a bactéria; (13) Citólise; (14) Desenvolvimento micelial; (15) Resposta ao cAMP; (16) Regulação da transcrição, dependente de DNA; (17) Transdução de sinal e (18) Proteínas que não possuem classificação biológica no *GO*.

Tabela 5. Resultados da identificação por espectrometria de massas de proteínas de sobrenadantes de cultivos de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc. N1-N17: Regiões de proteínas secretadas de cultivos de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc. O pI e a massa molecular (kDa) observada e teórica possuem a presença da região de peptídeo-sinal.

| Regiões | Proteínas identificadas ^a | Nº acesso ^b | pI/massa (kDa) observada | pI/massa (kDa) teórica | Score MASCOT ^c | Cobertura | Peptídeo identificado |
|---------|---|------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|-----------|--|
| N1 | Homóloga à Manosil-oligossacarídeo α -1,2-manosidase ^(B,18) | MA03305 | 50,00 | 5,17/56,02 | 993 | 60% | AVTAPVADHAK HAFPHDTLHPVTNTYVDDRAGWGVTVVDALDTAIVMNSLKIVQPMLDHIK ADDAISLFETNIRYLGGLSAYDLLK QLGADADKVDALLKQAQSLGDSLSVAFDTPSGIPDPTIFLNPTK NNIAEIGTLVLEWTR TYAELAQAENYLLHPK MYVYDPKTFGEYKDR HLVSHPTTR GQQTIPNSGHLASFAGGNFILGGIVLGEK AGFYNTSPYYILRPETVESIYYAYR YQDMAWDAFQQIR VNDAYAELTDVSK ETLKLYLTFADGRVHVQGGGATNQFVYNTEAHPVAVR |
| | N-acetil-beta-glicosaminidase (Nag1) ^(A,J,2) | MA04771 | 50,00 | 6,07/69,09 | 141 | 8% | DHPNYPYR IKEQIDGLALS TYQVVGNNVYSELSK EYLVANGIGAAPLVPK |
| N2 | Homóloga à Manosil-oligossacarídeo α -1,2-manosidase ^(B,18) | MA03305 | 48,00 | 5,17/56,02 | 1093 | 60% | HAFPHDTLHPVTNTYVDDRAGWGVTVVDALDTAIVMNSLKIVQPMLDHIK ADDAISLFETNIRYLGGLSAYDLLK QLGADADKVDALLKQAQSLGDSLSVAFDTPSGIPDPTIFLNPTK NNIAEIGTLVLEWTR TYAELAQAENYLLHPK MYVYDPKTFGEYKDR HLVSHPTTRKDLFSLAYRGQQTIPNSGHLASFAGGNFILGGIVLGEK AGFYNTSPYYILRPETVESIYYAYR YQDMAWDAFQQIR VNDAYAELTDVSK YLTLTFADGRVHVQGGGATNQFVYNTEAHPVAVR |

Tabela 5. (continuação)

| Regiões | Proteínas identificadas ^a | Nº acesso ^b | pI/massa (kDa) observada | pI/massa (kDa) teórica | Score MASCOT ^c | Cobertura | Peptídeo identificado |
|---------|---|------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|-----------|---|
| N2 | Proteína rica em prolina 5MeD ^(E,18) | MA04344 | 48,00 | 5,00/55,69 | 721 | 33% | DTGSGSNELYEVDLASGKTTLLNGNVNAGPPGSAINAIGFNSR STAGVGNVPWAQLDLSNTSPTFGR WDIQSHAYVKVRDLGISGR VADSTAPVEFIK ATLVNSNVNAGPSGSHINAIGFNIRDGYIYGATNSVNEAR IGEGGVAAVLPYK FGAVYAAADGHLYGADSLSGNIYR |
| | Quitinase [chiMaB4] ^(A,B,2) | MA01953 | 48,00 | 4,93/44,20 | 79 | 4% | LLIGVPAAPGAGGGYTSISK |
| N3 | Hipotética conservada ^(Q,18) | MA05109 | 45,00 | 5,34/50,16 | 787 | 45% | HEDLGSQTRAGNDVVGWTSSTGREFGIVGQTDGSAFVEIKDGSLSVSLGRLPTQDSSWTR VIGDHVYIGSEAPNHGLQIFDLTKLLTVDPKPNPPTFDVK AGLWMVDVSDPK TPYQGATYTHQGWTGPDHRYLLDDELDEQR TTYIVDAADLSKPVFTGYK AIDHNQYVIDGLSYMSNYASGLR GAWSVYPYFQSGHILVNSIER |
| N4 | Quitinase CHIT42 (<i>chit1</i>) [chiMaA1] ^(A,D,10) | MA03131 | 38,50 | 5,38/46,15 | 447 | 35% | QLYLLK TMLSIGGWWTWSTNFPAAASTAATR DELDAYAAKFAQGYHFQLSIAAPAGPANYNKLHLGDLGK IVLGMPIYGK AGATVIYDDVAK TQELISYDTPDITK GLGGSMFWEASADRQGPDSLIGTSSNKLGGPDATENLLNYPDSK |
| | Hipotética conservada ^(Q,18) | MA08606 | 38,50 | 5,47/39,83 | 284 | 28% | NGVFDMAAPSTDIDVTNLFLR SSHGDVNEIQIFLEIAALK VATETGQPAAVGELLTVGSVPKSSEFPVMIITGDR ASAFQATVVPNAGHGLNYNAPDVYR |
| | Homóloga à Tripeptidil-peptidase 1 ^(I,18) | MA01092 | 38,50 | 4,70/57,86 | 96 | 5% | SSNPSCLSLYSYGSAK MGIAGFIGQFASK |

Tabela 5. (continuação)

| Regiões | Proteínas identificadas ^a | Nº acesso ^b | pl/massa (kDa) observada | pl/massa (kDa) teórica | Score MASCOT ^c | Cobertura | Peptídeo identificado |
|---------|--|------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|-----------|--|
| N4 | Hipotética conservada ^(Q,18) | MA01263 | 38,50 | 4,90/37,69 | 49 | 13% | LYNAAVAVIDVSK EKYGGKVLTLQLSTEGTNVFSK SAEFVTK IYGVIEYFLDDK |
| | Glicana 1,3-β-glicosidase [truncada] ^(B,9) | MA07448 | 38,50 | 4,88/51,02 | 38 | 3% | EASAVPGVEEAQTFWR |
| N5 | Hipotética conservada ^(Q,18) | MA01263 | 37,50 | 4,90/37,69 | 433 | 39% | NGLTYFSKLYNAAVAVIDVSKNTVVDITITFDRDVAEFHASGVEIDQK VDLSGDKPK VVIPVTGLTGESGDDGVYLPEK VLLTQLSTEGTNVFSK IDSQYTPQNKGGFAVATVQIQDKIYGVIEYFLDDK TQFELEDLTK |
| | Hipotética conservada ^(Q,18) | MA08606 | 37,50 | 5,47/39,83 | 368 | 41% | NGVFDMAAPSTDIDVTNLFRL ALDAGYSTLTWDR SSHGDPVNEIQIFLEIAALK DGQLSGVAHK DSIGVHINFFGPGDFDPEVLKVATETGQPAAVGELLTVGSVPKSEFPGPVMIITGDR ASAFQATVVPNAGHGLNLYNAPDVYRAITDFIK |
| | Proteína rica em prolina 5MeD ^(E,18) | MA04344 | 37,50 | 5,00/55,69 | 85 | 2% | VADSTAPVEFIAK |
| | Homóloga à Tripeptidil-peptidase 1 ^(I,18) | MA01092 | 37,50 | 4,70/57,86 | 74 | 2% | MGIAGFIGQFASK |
| | Glicana 1,3-β-glicosidase [truncada] ^(B,9) | MA07448 | 37,50 | 4,88/51,02 | 43 | 8% | AQTD FENEFKTAAGLEGTNGGFTSAR EASAVPGVEEAQTFWR |
| | Proteína relacionada com precursor Glioxal oxidase ^(Q,18) | MA00808 | 37,50 | 4,91/118,25 | 31 | 1% | ALLQGAGSVPGDQMTVAK |
| | Hipotética conservada ^(E,18) | MA00379 | 37,50 | 7,02/36,14 | 30 | 4% | DFILQGVGALAIGR |

Tabela 5. (continuação)

| Regiões | Proteínas identificadas ^a | Nº acesso ^b | pl/massa (kDa) observada | pl/massa (kDa) teórica | Score MASCOT ^c | Cobertura | Peptídeo identificado |
|-----------|---|------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|-----------|--|
| N6 | Hipotética conservada (Q,18) | MA08606 | 36,56 | 5,47/39,83 | 281 | 31% | NGVFDMAAPSTDIDVTNLFLR DGQLSGVAHK DSIGVHINFFGPGDFDPEVLKVATETGQPAAVGELLTVGSVPKSEFFPGPVMITGDR ASAFQATVVPNAGHGLNLYNAPDVYR |
| | Hipotética conservada (E,18) | MA00379 | 36,56 | 7,02/36,14 | 96 | 20% | IAALGPSSVSANGIISSEYQVGVFVADSFTGLIGRLDVSTGHFQQGVWAYEELK DFILQGVGALAIGR |
| | Proteína relacionada com precursor Glioxal oxidase (Q,18) | MA00808 | 36,56 | 5,47/39,83 | 55 | 1% | ALLQGAGSVPGDQMTVAK |
| | Glicana 1,3-β-glicosidase [truncada] (B,9) | MA07448 | 36,56 | 4,88/51,02 | 38 | 3% | EASAVPGVEEAQTFWR |
| N7 | Proteína rica em cisteína (Q,18) | MA07422 | 34,68 | 5,73/36,66 | 200 | 26% | NVPTYDVGPDAK SCSSAGTSPVLSADKK LGLHNDNVYYAAPDSMIQR CTPGQAVNPSNEIYRDTYGLATGANK TPAFANAGHFSISK |
| | Quitinase [chiMaD1] (A,D,2) | MA08132 | 34,68 | 5,55/36,59 | 151 | 26% | QHGYNVISAAPPVILPDGTALWEDGMDANVK AAGATIVMSIGGATAAIDLSSSVADKFVSTIVPILK GLVIQGTIR GLMTWSINWDGSK |
| | Hipotética conservada (Q,18) | MA06224 | 34,68 | 4,78/25,22 | 146 | 14% | NSQSNVLSDSGTPPPFSGLK QAETTIGDDGSINR |
| | Proteína relacionada com precursor Glioxal oxidase (Q,18) | MA00808 | 34,68 | 5,47/39,83 | 54 | 1% | ALLQGAGSVPGDQMTVAK |

Tabela 5. (continuação)

| Regiões | Proteínas identificadas ^a | Nº acesso ^b | pi/massa (kDa) observada | pi/massa (kDa) teórica | Score MASCOT ^c | Cobertura | Peptídeo identificado |
|------------|--|------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|-----------|---|
| N8 | Hipotética conservada (Q,18) | MA06224 | 33,75 | 4,78/25,22 | 278 | 16% | NSQSNVLSDSGTPPFPSGLK YFVILKQAETTIGDDGSINR |
| | Glicana 1,3-β-glicosidase [truncada] (B,9) | MA07448 | 33,75 | 4,88/51,02 | 53 | 7% | TAAGLEGTNGGFTSARLYTMVQAGTGNDVISAIPAAISTK |
| | Quitinase [chiMaD1] (A,D,2) | MA08132 | 33,75 | 5,55/36,59 | 48 | 10% | AAGATIVMSIGGATAAIDLSSSSVADKFVSTIVPILK |
| | Hipotética conservada (B,2,14) | MA04655 | 33,75 | 5,70/44,95 | 31 | 4% | AGVGNSPDSILK VPTFWYTLR |
| N9 | Hipotética conservada (Q,18) | MA06224 | 32,00 | 4,78/25,22 | 266 | 30% | DLVPTVQNTYVSSIHVGAGLALVGQSAGTGYGR NSQSNVLSDSGTPPFPSGLK YFVILKQAETTIGDDGSINR |
| | Hipotética conservada (E,F,2) | MA05177 | 32,00 | 5,35/25,82 | 46 | 14% | TVPDLKPFPR ADGAPFDHFFVSDPPADGFSAVTK |
| | Hipotética conservada (B,2,14) | MA04655 | 32,00 | 5,70/44,95 | 34 | 2% | AGVGNSPDSILK |
| | Glicana 1,3-β-glicosidase [truncada] (B,9) | MA07448 | 32,00 | 5,70/44,95 | 29 | 7% | TSLLLGLWASAGQASFDNELAALK EASAVPGVEEAQTFR |
| N10 | Hipotética conservada (Q,18) | MA06224 | 31,87 | 4,78/25,22 | 229 | 16% | NSQSNVLSDSGTPPFPSGLK YFVILKQAETTIGDDGSINR |
| | Hipotética conservada (Q,3) | MA07089 | 31,87 | 5,26/25,84 | 166 | 33% | APALPQTGGASNLQPPEGSK VEPDSPGASQTDPFK APFLGHHLFNSAGVPEFILDGGK DAGVDAPANADKGPDTGAVAWLK |
| | Hipotética conservada (E,F,2) | MA05177 | 31,87 | 5,35/25,82 | 151 | 29% | VPSVTVPACPR TVPDLKPFPR ADGAPFDHFFVSDPPADGFSAVTKLDKPNQLWVSDVTIPLGLFNVDK |

Tabela 5. (continuação)

| Regiões | Proteínas identificadas ^a | Nº acesso ^b | pl/massa (kDa) observada | pl/massa (kDa) teórica | Score MASCOT ^c | Cobertura | Peptídeo identificado |
|---|--|------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|---------------|--|
| N10 | Protease do tipo subtilisina Pr1B ^(C,H,1,4) | MA09695 | 31,87 | 6,70/39,89 | 115 | 26% | SFVNTATDGNHGHGTHLAGVIGSAIYGVAK GAMANMSLGGGYSAAVNKAAASLVASGVFVVAAGGSGTDAK RLQELATKGVLTNVPSGTLNLLAFNGNPSG |
| | Hipotética conservada ^(Q,18) | MA09715 | 31,87 | 8,70/25,05 | 68 | 9% | SIVHGVFSSFQK TSVTMYNPTSK |
| | Glicana 1,3-β-glicosidase [truncada] ^(B,9) | MA07448 | 31,87 | 5,70/44,95 | 51 | 5% | AQTFENEFKTAAGLEGTNGGFTSAR |
| | Carboxipeptidase ^(K,L,1,5) | MA02991 | 31,87 | 6,45/44,21 | 48 | 2% | TPNNAALQALAK |
| | Provável Aldose 1-epimerase ^(F,M,11) | MA03561 | 31,87 | 5,94/46,78 | 27 | 4% | VGVDNLIPTGELLPNK |
| Hipotética conservada ^(B,2,14) | MA04655 | 31,87 | 5,70/44,95 | 24 | 3% | GNYIENAPYLFEK | |
| N11 | Hipotética conservada ^(E,F,2) | MA05177 | 31,00 | 5,35/25,82 | 184 | 46% | VPSVTVACPR TVPDLKPFPR ADGAPFDHFFVSDPPAD GFSAVTKLDKPNQLWVSDVTIPLGLFNVDK MNFRTVVSPTYPDQELGAWSVPNKASFHITPYFGNVK |
| | Hipotética conservada ^(Q,18) | MA09715 | 31,00 | 8,70/25,05 | 161 | 26% | SIVHGVFSSFQK SVHIGSWTLPSGAR TSVTMYNPTSK GTIGKPYEYGDCVGK FSTVSPDGWK |
| | Carboxipeptidase ^(K,L,1,5) | MA02991 | 31,00 | 6,45/44,21 | 106 | 10% | AVVDKYDFYMFPIVNVDFGK TPNNAALQALAK ADNVFTIELR |

Tabela 5. (continuação)

| Regiões | Proteínas identificadas ^a | Nº acesso ^b | pl/massa (kDa) observada | pl/massa (kDa) teórica | Score MASCOT ^c | Cobertura | Peptídeo identificado |
|------------|--|------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|-----------|---|
| N11 | Hipotética conservada (Q,3) | MA07089 | 31,00 | 5,26/25,84 | 93 | 28% | VEPDSPGASQTDPFVK APFLGHHLFNSAGVPEFILDGGKINVLAGKDAGVDAPANADKGPDTGAVAWLK |
| N12 | Hipotética conservada (Q,18) | MA09715 | 30,00 | 8,70/25,05 | 359 | 35% | SIVHGVFSSFQK SVHIGSWTLPSGARGIESSQLGFVEYYPWNSGTHK TSVTMYNPTSK GTIGKPYEYGDVCGK FSTVSPDGWK |
| | Hipotética conservada (E,F,2) | MA05177 | 30,00 | 5,35/25,82 | 163 | 25% | VPSVTVPACPR TVPDLKPFPR ADGAPFDHFFVSDPPADGFSVTK ASFHITPYFGNVK |
| | Hipotética conservada (B,2,515) | MA10205 | 30,00 | 6,91/33,47 | 79 | 9% | SDFGSPFIITLAPVASALSGGGNLSGFDYK |
| N13 | Hipotética conservada (Q,18) | MA09715 | 29,00 | 8,70/25,05 | 315 | 28% | SIVHGVFSSFQK SVHIGSWTLPSGARGIESSQLGFVEYYPWNSGTHK TSVTMYNPTSK FSTVSPDGWK |
| | Protease tripsina (C,1) | MA02007 | 29,00 | 8,18/26,25 | 180 | 21% | AGSLLSGSGGK HPNFDNSNLDNDVAVWKLATDIPESATIK LQEGGATPSQLQKVTVPVVAR YGVYTRLANYDSFVK |
| | Hipotética conservada (Q,18) | MA08606 | 29,00 | 5,47/39,83 | 52 | 5% | NGVFDMAAPSTDIDVTNLFLR |
| N14 | Homóloga à N,O-diacetilmuramidase (A,G,6,7) | MA09595 | 26,00 | 6,94/24,23 | 457 | 29% | ATEGTTYIDPSFSSHYTGATQAGLIR YATSVGTLTAGWSYQTIWQNSDKAPWGGDNDIFNGNLDQLK |
| | N,O-diacetilmuramidase não caracterizada (A,G,6,7,12,13) | MA00937 | 26,00 | 7,74/25,60 | 345 | 23% | GFDISSYQPNVDFHK GAYHFAHPGQNASAEADFFVK DFADTYHEK DTCPLVLAR |

Tabela 5. (continuação)

| Regiões | Proteínas identificadas ^a | Nº acesso ^b | pl/massa (kDa) Observada | pl/massa (kDa) teórica | Score MASCOT ^c | Cobertura | Peptídeo identificado |
|------------|---|------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------------------|-----------|--|
| N14 | Hipotética conservada ^(Q,18) | MA05482 | 26,00 | 7,66/22,00 | 123 | 22% | TLLAGLKVATPLSGDGYSRITLPTWETIEGTCNAR SHYSLTITDAEK |
| N15 | Homóloga à N,O- diacetilmuramidase ^(A,G,6,7) | MA09595 | 25,00 | 6,94/24,23 | 526 | 14% | ATEGTTYIDPSFSSHYTGATQAGLIR CPLVVAR |
| | Hipotética conservada ^(Q,18) | MA05482 | 25,00 | 7,66/22,00 | 118 | 11% | VATPLSGDGYSR SHYSLTITDAEK |
| | Homóloga à Manosil- oligossacarídeo α-1,2- manosidase ^(B,18) | MA03305 | 25,00 | 5,17/56,02 | 38 | 15% | AGWGVTVVDALDTAIVMNSLK YLGGLLSAYDLLK NNIAEIGTLVLEWTR GQQTIPNSGHLASFAGGNFILGGIVLGECK ANDDGVVTSGTDPGTK |
| | Hipotética conservada (N,O,16,17) | MA01239 | 25,00 | 8,44/68,50 | 32 | 2% | |
| N16 | Hipotética conservada (N,O,16,17) | MA01239 | 22,50 | 8,44/68,50 | 117 | 9% | EGYWYDTK QFGEILRANDDGVVTSGTDPGTYKLELLISYVVKLDDGHWAYVK YTWLNR |
| | Hipotética ^(Q,18) | MA03974 | 22,50 | 9,04/19,20 | 111 | 38% | WILQQTRLVLPPTWNGGWER KFLELK VLQDFDK GVPNEPDAKGSTLWVIGISQK AGLGEVNWLR FWAQGGSK TISCNHINAPVPIEAMQAVA |
| N17 | Hipotética conservada ^(Q,3) | MA03234 | 20,00 | 4,61/20,49 | 41 | 15% | |

^aProteína identificada de acordo com o banco de dados SABIA (Almeida *et al.*, 2004).

^bNúmero de acesso do banco de dados SABIA (Almeida *et al.*, 2004).

^cScore do MASCOT: Íons $score - 10 * \log(P)$ – onde P é a probabilidade do *match* não ser um evento aleatório.

Categorização funcional das proteínas identificadas baseado no banco de dados do *Gene Ontology (GO)*. **Categorização Molecular:** (A) Ligação entre cátion; (B) Atividade de hidrolase; (C) Atividade do tipo serino-endopeptidase; (D) Atividade de quitinase; (E) Atividade catalítica; (F) Ligação à carboidrato; (G) Atividade de lisozima; (H) Idêntica à proteína de ligação; (I) Atividade de peptidase; (J) Atividade de beta-N-acetilhexosaminidase;

(**K**) Atividade metalocarboxipeptidase; (**L**) Ligação ao íon zinco; (**M**) Atividade de isomerase; (**N**) Atividade de carbono-nitrogênio ligases; (**O**) Atividade de transferase; (**P**) Atividade de metaloendopeptidase e (**Q**) Proteínas que não possuem classificação molecular no *GO*. **Categorização Biológica:** (**1**) Proteólise; (**2**) Processo metabólico dos carboidratos; (**3**) Interação com o hospedeiro via proteínas secretadas pelo sistema de secreção do tipo II; (**4**) Regulação negativa da atividade catalítica; (**5**) Maturação; (**6**) Processo catabólico de macromoléculas da parede celular; (**7**) Processo catabólico do peptidoglicano; (**8**) Patogênese; (**9**) Processo metabólico; (**10**) Processo catabólico da quitina; (**11**) Processo metabólico da hexose; (**12**) Resposta de defesa a bactéria; (**13**) Citólise; (**14**) Desenvolvimento micelial; (**15**) Resposta ao cAMP; (**16**) Regulação da transcrição, dependente de DNA; (**17**) Transdução de sinal e (**18**) Proteínas que não possuem classificação biológica no *GO*.

5.3 Análises das proteínas secretadas de *M. anisopliae*

A análise de proteínas de sobrenadante de cultivos de *M. anisopliae* realizados com três diferentes fontes de carbono (glicose, quitina e GlcNAc) utilizando abordagens proteômicas, como eletroforese uni e bidimensional e identificação por MS, possibilitou identificar através de comparações com bancos de dados de seqüências de aminoácidos, 38 proteínas de *M. anisopliae* (linhagem E6): 6 proteínas secretadas de culturas de *M. anisopliae* na presença de glicose (G1 à G9); 8 proteínas secretadas de culturas de *M. anisopliae* na presença de quitina (Q1 à Q7); e 30 proteínas secretadas de culturas de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc (N1 à N17) (Figura 13).

Como neste trabalho foram utilizadas diferentes abordagens (géis 1-D e 2-D) as identificações não podem ser comparadas entre os cultivos. Porém, foi analisado que a maioria das proteínas secretadas de *M. anisopliae* identificadas foram exclusivas de uma única fonte de carbono (glicose, quitina e GlcNAc). E das 38 proteínas identificadas de *M. anisopliae*, 6 foram detectadas em diferentes condições de cultivo do fungo (Tabela 6 e Figura 13). As duas proteínas hipotéticas conservadas MA03234 e MA08606 foram identificadas nas amostras de proteínas secretadas dos cultivos de *M. anisopliae* na presença de glicose e de GlcNAc. Quatro proteínas identificadas: duas proteínas hipotéticas conservadas MA05109 e MA05177, a proteína homóloga à tripeptidil-peptidase 1 (MA01092) e a proteína protease tripsina (MA02007) foram comumente identificadas nas amostras de proteínas secretadas dos cultivos de *M. anisopliae* na presença de quitina e de GlcNAc. Os cultivos de *M. anisopliae* na presença de glicose e de quitina não possuíram nenhuma proteína identificada em comum.

Tabela 6. Proteínas identificadas de *M. anisopliae* que foram detectadas em diferentes condições de cultivo do fungo. Glicose: Proteínas secretadas dos cultivos de *M. anisopliae* na presença de glicose. **Quitina:** Proteínas secretadas dos cultivos de *M. anisopliae* na presença de quitina. **GlcNAc:** Proteínas secretadas dos cultivos de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc.

| Nº acesso ^b | Proteína Identificada ^a | Glicose | Quitina | GlcNAc |
|------------------------|------------------------------------|---------|---------|--------|
| MA03234 | Hipotética conservada | + | - | + |
| MA08606 | Hipotética conservada | + | - | + |
| MA05109 | Hipotética conservada | - | + | + |
| MA05177 | Hipotética conservada | - | + | + |
| MA01092 | Homóloga à Tripeptidil-peptidase 1 | - | + | + |
| MA02007 | Protease tripsina | - | + | + |

^aNúmero de acesso do banco de dados SABIA (Almeida *et al.*, 2004).

^bProteína identificada de acordo com o banco de dados SABIA (Almeida *et al.*, 2004).

(+) presente

(-) ausente

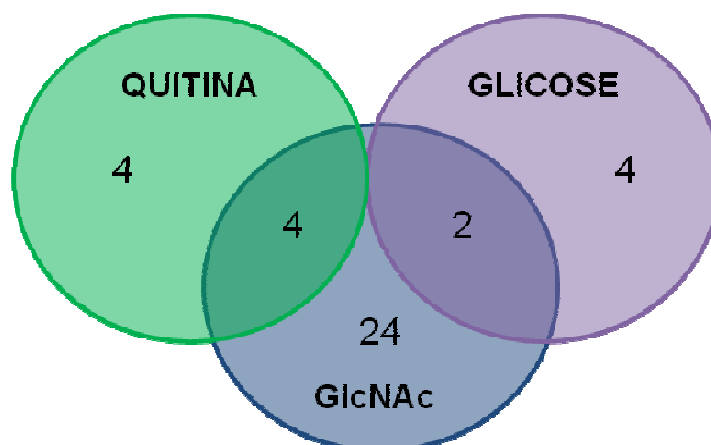


Figura 13. Esquema das proteínas identificadas de *M. anisopliae* nos três diferentes cultivos. A sobreposição dos círculos significa a presença em mais de uma condição. **Glicose:** Seis proteínas secretadas identificadas nos cultivos de *M. anisopliae* na presença de glicose, sendo quatro exclusivas desta condição e duas também foram identificadas na condição de cultivo na presença GlcNAc. **Quitina:** Oito proteínas secretadas identificadas nos cultivos de *M. anisopliae* na presença de quitina, sendo quatro exclusivas desta condição e quatro também foram identificadas na condição de cultivo na presença GlcNAc. **GlcNAc:** Trinta proteínas secretadas identificadas nos cultivos de *M. anisopliae* na presença GlcNAc, sendo vinte e quatro proteínas exclusivas desta condição, quatro também foram identificadas também na condição de cultivo na presença quitina, e duas identificadas também na condição de cultivo na presença glicose.

5.4 Caracterização das proteínas secretadas de *M. anisopliae* através de ferramentas de bioinformática

Após a identificação de 38 proteínas secretadas de culturas de *M. anisopliae* na presença de diferentes fontes de carbono (glicose, quitina e GlcNAc) utilizou-se ferramentas de bioinformática, que realizam predição *in silico*, para as análises dos resultados obtidos por MS.

O *software* MASCOT (*Matrix Science*; <http://www.matrixscience.com>) é um programa que permite a comparação dos espectros gerados pelo MS com os bancos de sequências de proteínas. Quando os peptídeos são detectados, este *software* mostra a cobertura e a posição dos peptídeos na proteína identificada. A Figura 14 ilustra a cobertura dos peptídeos identificados por MS, e a sua posição em relação à sequência dos aminoácidos das proteínas identificadas. Além disso, a ferramenta *SignalP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) foi utilizada para caracterizar a presença ou ausência dos aminoácidos que compõem o sinal de secreção (peptídeo-sinal) de cada proteína identificada.

Proteína rica em prolina 5MeD (MA04344) Cobertura 33%

Table with 3 columns: ID, protein sequence, and alignment. Rows include 1, 51, 101, 151, 201, 251, 301, 351, 401, 451, 501.

Quitinase [chiMaB4] (MA01953) Cobertura 4%

Table with 3 columns: ID, protein sequence, and alignment. Rows include 1, 51, 101, 151, 201, 251, 301, 351, 401.

Glicana 1,3-β-glicosidase [truncada] (MA07448) Cobertura 8%

Table with 3 columns: ID, protein sequence, and alignment. Rows include 1, 51, 101, 151, 201, 251, 301, 351, 401, 451, 501.

Quitinase CHIT42 (chit1) [chiMaA1] (MA03131) Cobertura 35%

Table with 3 columns: ID, protein sequence, and alignment. Rows include 1, 51, 101, 151, 201, 251, 301, 351, 401.

Proteína relacionada com precursor Glicoxal oxidase (MA00808) Cobertura 1%

Table with 3 columns: ID, protein sequence, and alignment. Rows include 1, 51, 101, 151, 201, 251, 301, 351, 401, 451, 501, 551, 601, 651, 701, 751, 801, 851, 901, 951, 1001, 1051, 1101.

Hipotética conservada (MA01263) Cobertura 39%

Table with 3 columns: ID, protein sequence, and alignment. Rows include 1, 51, 101, 151, 201, 251, 301, 351.

Hipotética conservada (MA00379) Cobertura 20%

Table with 3 columns: ID, protein sequence, and alignment. Rows include 1, 51, 101, 151, 201, 251, 301.

Proteína rica em cisteína (MA07422) Cobertura 26%

Table with 3 columns: ID, protein sequence, and alignment. Rows include 1, 51, 101, 151, 201, 251, 301.

Quitinase [chiMaD1] (MA08132) Cobertura 26%

Table with 3 columns: ID, protein sequence, and alignment. Rows include 1, 51, 101, 151, 201, 251, 301.

Hipotética conservada (MA06224) Cobertura 14%

Table with 3 columns: ID, protein sequence, and alignment. Rows include 1, 51, 101, 151, 201.

Hipotética conservada (MA04655) Cobertura 4%

Table with 3 columns: ID, protein sequence, and alignment. Rows include 1, 51, 101, 151, 201, 251, 301, 351, 401.

Hipotética conservada (MA07089) Cobertura 33%

Table with 3 columns: ID, protein sequence, and alignment. Rows include 1, 51, 101, 151, 201.

Protease do tipo subtilisina Pr1B (MA09695) Cobertura 26%

Table with 3 columns: ID, protein sequence, and alignment. Rows include 1, 51, 101, 151, 201, 251, 301, 351.

Hipotética conservada (MA09715) Cobertura 35%

Table with 3 columns: ID, protein sequence, and alignment. Rows include 1, 51, 101, 151, 201.

Carboxipeptidase (MA02991) Cobertura 10%

Table with 3 columns: ID, protein sequence, and alignment. Rows include 1, 51, 101, 151, 201, 251, 301, 351, 401.

■ Proteína aa
■ Peptideo-sinal

Figura 14. (continuação)

Provável Aldose 1-epimerase (MA03561) Cobertura 4%

1 MKWTLQFLAF AALAVLPSTC VADANDNTNN EPKPKDKGKY WIYGDGISAA
 51 FVAYGASVSN FMVKDQYGLIE RDIVTGFDNA SYYGIDKQHP HFGGVPGRYA
 101 NRIRKSTFEI DGKHYVKAN ENPTKQHPDG VDTLHGPGDG WDRNFTVVS
 151 HSNHSTVTFSL VDPDGKEGFP GEVVTVVVYS LNGRDWDLMK VAEATTKKTP
 201 IMLSSHTYWN LDGFANNQTS KVFNHTLYMP YAGFRVGVND ILIPTGELLP
 251 NKKGGVNDWF SEPQIGASF GDEGMVNNCG FNCTGYDNCF INNRAIGPY
 301 DWRKQGPVTT LSSPWSGIQL DVFTDQDAFQ IYSCNQNGT MALKKTQGVV
 351 GDNKDKFPRT IPKYGCVVLE VQDYIDGINN PEWMRGGKQI YEPGGDPYVL
 401 QAKYRFSLVS DHEEKKRGGP SS

Hipotética conservada (MA10205) Cobertura 9%

1 MLPLIEEKGI ALTHLIVCSL HVNENQIHL NDYPPSNPMF YTLWNETAVM
 51 KNAGVKIMGM VGGAAPGSFS SGTLDGDTAT FNKYQGQLRD VIKKFKLQGL
 101 DIDVEQPMQ AGIERLVDKL RSDFGFSFI TLAPVASALS GGGNLSGFDY
 151 KLLDSRKGSK INFYNGQFYS GFGTMSRPTD YTNVVSNGFS ASRVVAGQLT
 201 SPSNGYGYIP YEQLNATVIS LRDYQGIGG VMGWEYFNSA PGGTDEPWKW
 251 AQIMTQILRP NSVEKLAIST EIAQKLATAF NDSVKSDPVW AIKSGGVLVG
 301 DYHRMINV

Homóloga à N,O-diacetilmuramidase (MA09595)

Cobertura 29%

1 MKSVAFFAVL ASMANLATA VAGFDISHYQ PNVDFKKAYA DGARFVIIKA
 51 TEGTTYIDPS FSSHYTGATQ AGLIRGGYHF AHPGSGGAA QATYFLAHGG
 101 GWSRDGITLP GMVDLEYNPS GSTCYGLSAS AMVSWISDFV ETYRSKTGVY
 151 PLIYTSTSWW NQCTGSSTAF GSKCPLVVAR YATSVGTLPA GWSYQTIWQN
 201 SDKAPWGGDN DIFNGNLDQL KRANAS

N,O-diacetilmuramidase não caracterizada (MA00937)

Cobertura 23%

1 MKRSGAISLG FAALVSSAAA SPVQLEQRAA TVKGFDISSY QPNVDFHKAY
 51 ADGARFVVIK ATEGTTYTDK TFSKHYTAT EAKLIRGAYH FAHPGQNAS
 101 AEADFFVKNQ GWSGDGITL PGMVDLESEK GHPQCWGLSH SAMVAWIRDF
 151 ADTYHEKTR WPLYTNPSW WSSCTGNSQA FKDTCPVLVA RYAGSPGAIP
 201 GGWPAQTIWQ NSDKSPWGGD SDVFNGDLAR LKKLATG

Hipotética conservada (MA05482) Cobertura 22%

1 MKFSSASFLV VSAAAVVLGV PVPAPPGIPT ASTARTLLAG LKVATPLSGD
 51 GYSRTLFPPTW ETIEGTCNAR EFVLKRDGTD VQNTACVAQ SGNVVSPYDG
 101 VSFTAASDLD IDHMVPLKNA WISGASQWTT DKRKGFANDI TRPQLWAVSA
 151 HANRAKGDSS PDEWKPPLKT FWCTYSKSWI QVKSHYSLTI TDAEKGALSG
 201 MLDS

Hipotética conservada (MA01239) Cobertura 9%

1 MKLSAITSSL LVCGLGASAV PPTSAPFLKT PSRPLLQWTP PSVVPQMRPA
 51 FQAKIDWDLN NNHTIQTPSG LRASWWSREG YWYDTKGRQF GEILRANDDG
 101 VVTSGTDPGT KYLELLISYV VKLDDGHWAY VKHTGGAIVR QYQNGIVRVE
 151 TDSKYYTWLN RVDFIAPGTF NGTEVMTVNH YFPNFEPRVD IPLEPSLVTV
 201 VCNRKDVPLK KGWLRAYLDG LDKCDVFDK LFLAGIITP PRHQGTIPPD
 251 CREYLIEFGN QWANIKIEKV QQLRVAGVSY GRLLAIAPPR APTSATNSPP
 301 QLRVAVNPAP FTAQVVQALV KDGAVLAFN PRGDGYQSPA GSSSGSAAAL
 351 AAYDWLNCAL GTDTSRGRRR PAMANGVWQF RPFHDSISLS VLCKTYAKFD
 401 THCVFARSLN ILERVITSWI PPPPIALSMS QRSYRLIYS EDYMSEADTD
 451 QMKIIDAFVK NAEDMLAATV TQFSIRDSWK QSHPPDTCDD TEEYLDVIR
 501 KTYHYEFYHS TDDLRLKLYSG KHQGRPPYVI PFVQRRAQG ATVSTAQHEE
 551 GTRRLIVYRT WLHEQLLGDN NIETFMLLPV ANAKPVYRDE VLPPLRSNPP
 601 WINSLFHQ

Hipotética (MA03974) Cobertura 38%

1 MSNNDTPVAF VKRWILQQTR LVLPPTWNGG WERWAQGQIA MLMEGQDGYQ
 51 VWTEQNIYLD HPNYAVDLF RKPPGVRGVR KFLELKCYSY VNNDTAYQFI
 101 TRVLDQFDKV TKLKLTRGVP NEPDAKSTL WVTIGISQKF RDAITRAGLG
 151 EVNWLRFKRE EAGGFP

■ Cobertura aa
 ■ Peptídeo-sinal

Figura 14. (continuação)

As 38 proteínas secretadas identificadas nas culturas de *M. anisopliae* (6 proteínas na presença da fonte de carbono glicose, 8 proteínas na presença da fonte de carbono quitina e 30 proteínas na presença da fonte de carbono GlcNAc) estão ilustradas na Figura 15 conforme a classificação de seus domínios através da ferramenta de bioinformática *InterProScan* (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>). Observou-se também que das 38 proteínas identificadas apenas seis proteínas não possuem peptídeo-sinal.

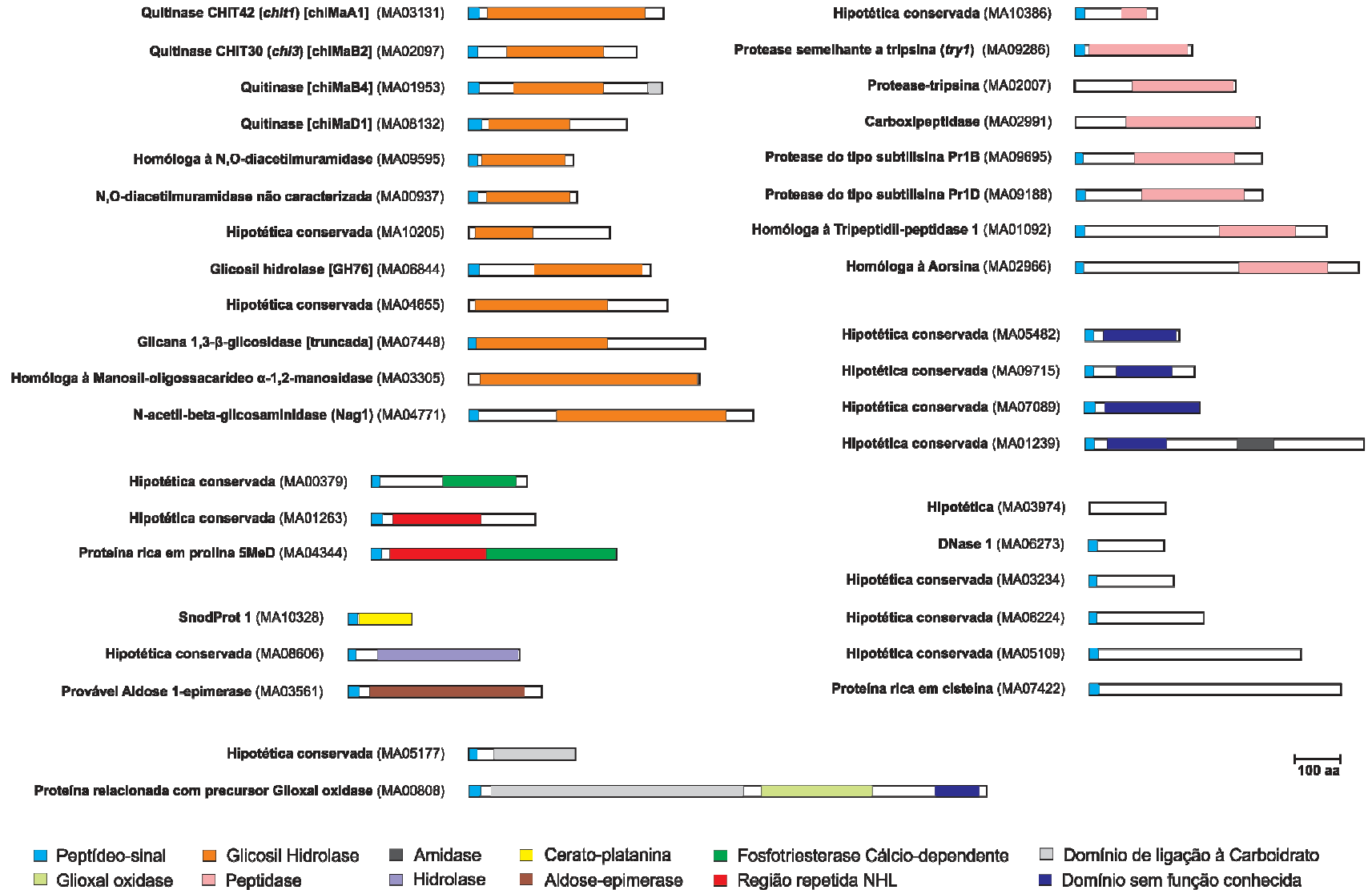


Figura 15. Domínios das 38 proteínas identificadas de *M. anisopliae* (linhagem E6).

As proteínas identificadas também foram caracterizadas pela utilização de ferramentas *in silico* para a análise do tamanho das seqüências, íntrons, massa molecular e o ponto isoelétrico das proteínas. A ferramenta *FEGESH* (<http://www.softberry.com>) possibilitou caracterizar as proteínas identificadas informando o tamanho de cada proteína em aminoácidos, bem como o número e o tamanho dos íntrons. A ferramenta *pI/Mw tool* (http://expasy.org/tools/pi_tool.html) foi utilizada para predição de massa molecular (kDa) e pI teóricos, esta ferramenta também possibilitou a predição do tamanho em kDa da proteína madura, desconsiderando a região do peptídeo-sinal predita pela ferramenta *SignalP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Estas características estão ilustradas na Tabela 7. Para a identificação de proteínas transportadoras foi utilizado a ferramenta *TCDB* (<http://www.tcdb.org/>), porém nenhuma proteína foi classificada como transportadora.

As Tabelas 3, 4 e 5 e a Figura 16 ilustram a classificação funcional das proteínas identificadas de *M. anisopliae* através do banco de dados do *Gene Ontology* (CO) utilizando o *software Blast2GO* (<http://www.blast2go.org/>). As proteínas foram classificadas de acordo com suas funções moleculares (Figura 16A) e pelos seus envolvimento em processos biológicos (Figura 16B).

Através da ferramenta *Blastp* do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) as proteínas identificadas de *M. anisopliae* linhagem E6 foram comparadas com as proteínas de *M. anisopliae* linhagem ARSEF23. Na Tabela 8 é possível visualizar as proteínas de *M. anisopliae* linhagem ARSEF23 que tiveram maior identidade com as proteínas identificadas de *M. anisopliae* linhagem E6.

Tabela 7. Características das proteínas identificadas de *M. anisopliae* em relação a nucleotídeos, aminoácidos, íntrons, pI e massa molecular. Informando o tamanho de cada proteína identificada em nucleotídeos, aminoácidos e kDa; e os seus respectivos pontos isoeletricos (pI). O tamanho em kDa da proteína madura está desconsiderando a seqüência de peptídeo-sinal predita. Para estas predições foram utilizadas as ferramentas de bioinformática *FEGETH*, *pI/Mw tool* e *SignalP*.

| Nº acesso ^a | Proteína Identificada ^b | Tamanho aminoácidos | pI/massa (kDa) teórico | massa (kDa) teórica prot. madura | Nº íntrons | Nº nucleotídeos nos íntrons |
|------------------------|---|---------------------|------------------------|----------------------------------|------------|-----------------------------|
| MA06844 | Glicosil hidrolase (GH76) | 397 | 5,23/43,36 | 41,10 | - | - |
| MA03234 | Hipotética conservada | 185 | 4,61/20,49 | 18,86 | - | - |
| MA06273 | DNase 1 | 165 | 4,90/17,69 | 15,91 | - | - |
| MA10386 | Hipotética conservada | 178 | 9,24/18,92 | 16,92 | 1 | 84 |
| MA10328 | SnodProt 1 | 137 | 5,16/14,21 | 12,46 | 1 | 66 |
| MA08606 | Hipotética conservada | 375 | 5,47/39,83 | 38,27 | 2 | 57 - 80 |
| MA02966 | Homóloga à Aorsina | 619 | 5,00/65,77 | 64,06 | 3 | 54 - 54 - 62 |
| MA01092 | Homóloga à Tripeptidil-peptidase 1 | 549 | 4,70/57,86 | 56,04 | 3 | 116 - 59 - 66 |
| MA09286 | Protease semelhante à tripsina (<i>try1</i>) | 257 | 4,93/26,31 | 24,17 | 2 | 93 - 71 |
| MA02097 | Quitinase CHIT30 (<i>chi3</i>) [chiMaB2] | 318 | 5,24/34,14 | 32,16 | 1 | 56 |
| MA09188 | Protease do tipo subtilisina Pr1D | 407 | 5,93/42,71 | 40,86 | 1 | 62 |
| MA02007 | Protease tripsina | 352 | 6,59/36,48 | 36,48 | 2 | 68 - 57 |
| MA05109 | Hipotética conservada | 463 | 5,34/50,16 | 48,26 | 1 | 116 |
| MA05177 | Hipotética conservada | 231 | 5,35/25,82 | 24,21 | - | - |
| MA03305 | Homóloga à Manosil-oligossacarídeo α -1,2-manosidase | 504 | 5,17/56,02 | 56,02 | 3 | 130 - 61 - 127 |
| MA04771 | N-acetil-beta-glicosaminidase (Nag1) | 621 | 6,07/69,09 | 66,98 | - | - |
| MA04344 | Proteína rica em prolina 5MeD | 535 | 5,00/55,69 | 53,51 | - | - |

Tabela 7. (continuação)

| Nº acesso ^a | Proteína Identificada ^b | Tamanho nucleotídeos | Tamanho aminoácidos | pI/massa (kDa) teórico | massa (kDa) teórica prot. madura | Nº íntrons | Nº nucleotídeos nos íntrons |
|------------------------|--|----------------------|---------------------|------------------------|----------------------------------|------------|-----------------------------|
| MA01953 | Quitinase [chiMaB4] | 1442 | 422 | 4,93/44,20 | 41,78 | 3 | 62 - 60 - 54 |
| MA07448 | Glicana 1,3-β-glicosidase [truncada] | 1548 | 516 | 4,88/51,02 | 49,44 | - | - |
| MA03131 | Quitinase CHIT42 (<i>chit1</i>) [chiMaA1] | 1521 | 425 | 5,38/46,15 | 43,94 | 3 | 99 - 67 - 80 |
| MA01263 | Hipotética conservada | 1140 | 358 | 4,90/37,69 | 35,47 | 1 | 66 |
| MA00808 | Proteína relacionada com precursor Gloxal oxidase | 3751 | 1131 | 4,91/118,25 | 115,80 | 4 | 74 - 72 - 110 - 102 |
| MA02991 | Carboxipeptidase | 1537 | 403 | 6,45/44,21 | 44,21 | 4 | 81 - 65 - 98 - 84 |
| MA03561 | Provável Aldose 1-epimerase | 1328 | 423 | 5,94/46,78 | 44,41 | 1 | 59 |
| MA09695 | Protease do tipo subtilisina Pr1B | 1313 | 387 | 6,70/39,89 | 38,34 | 3 | 51 - 49 - 52 |
| MA07422 | Proteína rica em cisteína | 1120 | 343 | 5,73/36,66 | 34,38 | 1 | 91 |
| MA08132 | Quitinase [chiMaD1] | 1038 | 346 | 5,55/36,59 | 33,81 | - | - |
| MA03974 | Hipotética | 574 | 167 | 9,04/19,20 | 19,20 | 1 | 73 |
| MA10205 | Hipotética conservada | 927 | 309 | 6,91/33,47 | 33,47 | - | - |
| MA07089 | Hipotética conservada | 813 | 251 | 5,26/25,84 | 23,50 | 1 | 60 |
| MA09595 | Homóloga à N,O-diacetilmuramidase | 758 | 228 | 6,94/24,23 | 22,30 | 1 | 74 |
| MA00937 | N,O-diacetilmuramidase não caracterizada | 770 | 238 | 7,74/25,60 | 23,71 | 1 | 56 |
| MA04655 | Hipotética conservada | 1302 | 434 | 5,70/44,95 | 44,95 | - | - |
| MA00379 | Hipotética conservada | 1017 | 339 | 7,02/36,14 | 34,35 | - | - |

Tabela 7. (continuação)

| Nº acesso^a | Proteína Identificada^b | Tamanho nucleotídeos | Tamanho aminoácidos | pI/massa (kDa) Teórico | massa (kDa) teórica prot. madura | Nº íntrons | Nº nucleotídeos nos íntrons |
|------------------------------|--|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------|---|-------------------|-------------------------------------|
| MA06224 | Hipotética conservada | 717 | 239 | 4,78/25,22 | 23,75 | - | - |
| MA09715 | Hipotética conservada | 720 | 240 | 8,70/25,05 | 23,20 | - | - |
| MA05482 | Hipotética conservada | 789 | 206 | 7,66/22,00 | 20,13 | 3 | 60 - 57 - 54 |
| MA01239 | Hipotética conservada | 4255 | 610 | 8,44/68,50 | 66,68 | 7 | 67 - 199 - 1916 - 73 - 63 - 52 - 55 |

^aNúmero de acesso do banco de dados SABIA (Almeida *et al.*, 2004).

^bProteína identificada de acordo com o banco de dados SABIA (Almeida *et al.*, 2004).

Figura 16. Classificação funcional das proteínas identificadas de *M. anisopliae* pelo banco de dados do *Gene Ontology* (CO). A Figura ilustra a porcentagem (%) das 38 proteínas se classificam em cada categoria. As proteínas foram classificadas em duas categorias: molecular e biológica. **Painel A.** Categorização Molecular: (A) Ligação entre cátion; (B) Atividade de hidrolase; (C) Atividade do tipo serino-endopeptidase; (D) Atividade de quitinase; (E) Atividade catalítica; (F) Ligação à carboidrato; (G) Atividade de lisozima; (H) Idêntica à proteína de ligação; (I) Atividade de peptidase; (J) Atividade de beta-N-acetilhexosaminidase; (K) Atividade metalocarboxipeptidase; (L) Ligação ao íon zinco; (M) Atividade de isomerase; (N) Atividade de carbono-nitrogênio ligases; (O) Atividade de transferase; (P) Atividade de metaloendopeptidase e (Q) Proteínas que não possuem classificação molecular no GO. **Painel B.** Categorização Biológica: (1) Proteólise; (2) Processo metabólico dos carboidratos; (3) Interação com o hospedeiro via proteínas secretadas pelo sistema de secreção do tipo II; (4) Regulação negativa da atividade catalítica; (5) Maturação; (6) Processo catabólico de macromoléculas da parede celular; (7) Processo catabólico do peptideoglicano; (8) Patogênese; (9) Processo metabólico; (10) Processo catabólico da quitina; (11) Processo metabólico da hexose; (12) Resposta de defesa a bactéria; (13) Citólise; (14) Desenvolvimento micelial; (15) Resposta ao cAMP; (16) Regulação da transcrição, dependente de DNA; (17) Transdução de sinal e (18) Proteínas que não possuem classificação biológica no GO (vide pg. 80).

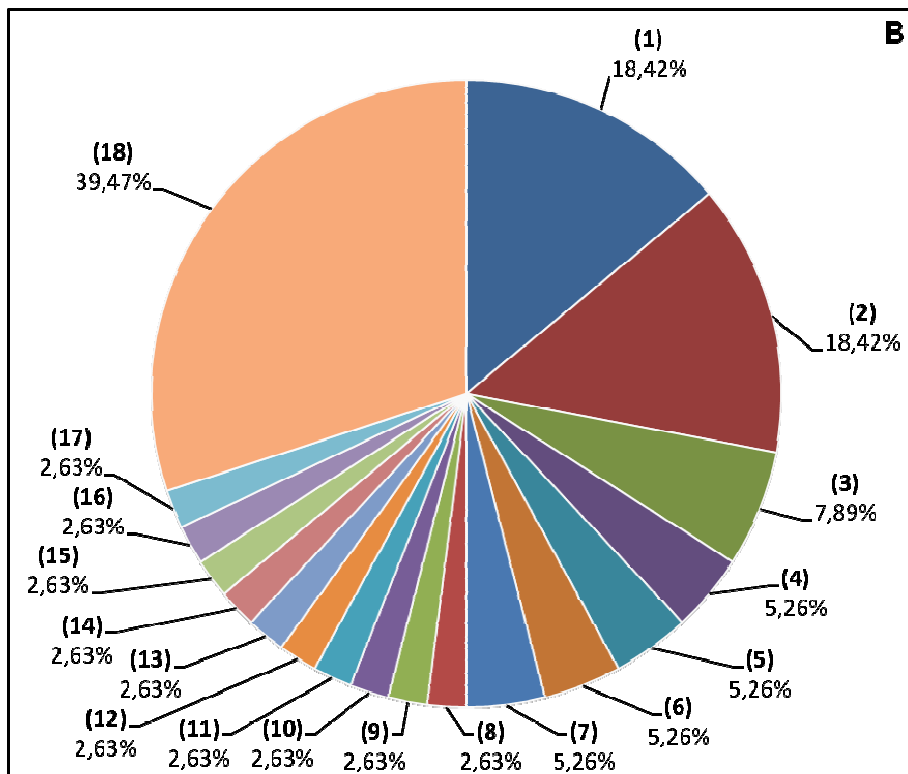
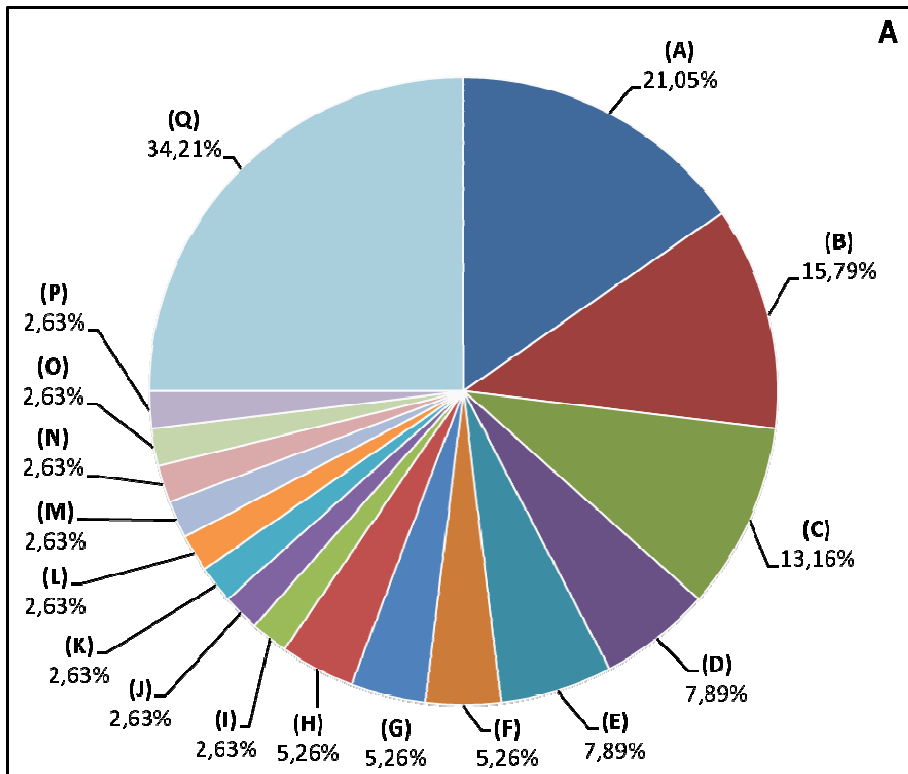


Tabela 8. Blastp das proteínas identificadas de *M. anisopliae* linhagem E6 com as proteínas de *M. anisopliae* linhagem ARSEF23. As proteínas identificadas foram comparadas na plataforma do NCBI através do *Blastp* com proteínas de *M. anisopliae* linhagem ARSEF23.

| Nº acesso ^a | Proteína <i>M. anisopliae</i> E6 ^b | Identidade | Nº acesso NCBI | Proteína <i>M. anisopliae</i> ARSEF 23 |
|------------------------|---|------------|-------------------|--|
| MA06844 | Glicosil hidrolase (GH76) | 99% | EFY98294 | Glicosil hidrolase |
| MA03234 | Hipotética conservada | 98% | EFZ01566 | Hipotética MAA_02795 |
| MA06273 | DNase 1 | 99% | EFY95358 | DNase 1 |
| MA10386 | Hipotética conservada | 94% | EFZ01806 | Hipotética MAA_03035 |
| MA10328 | SnodProt 1 | 99% | EFZ01862 | Prot. elicitora de resp. de plantas |
| MA08606 | Hipotética conservada | 97% | EFY97513 | Hipotética MAA_07155 |
| MA02966 | Homóloga à Aorsina | 98% | EFZ04234 | Put. protease do tipo serino alcalina AorO |
| MA01092 | Homóloga à Tripeptidil-peptidase 1 | 98% | EFY97249 | Precursor de Tripeptidil-peptidase 1 |
| MA09286 | Protease sem. à tripsina (<i>try1</i>) | 99% | EFZ00666 | Protease tripsina |
| MA02097 | Quitinase CHIT30 (<i>chi3</i>) [chiMaB2] | 98% | EFZ04138 | Put. endochitinase <i>chi3</i> |
| MA09188 | Protease do tipo subtilisina Pr1D | 99% | EFY95737 | Protease do tipo subtilisina Pr1D |
| MA02007 | Protease tripsina | 88% | EFY94881 | Protease tripsina |
| MA05109 | Hipotética conservada | 99% | EFY99967 | Prot. contendo o dom. regulatório P |
| MA05177 | Hipotética conservada | 99% | EFZ00032 | Hipotética MAA_04960 |
| MA03305 | Homóloga à Manosil-oligos. α -1,2-manosidase | 98% | EFZ02424 | 1,2- α -D-manosidase |
| MA04771 | N-acetil-beta-glicosaminidase (Nag1) | 100% | EFY94972 | N-acetilglicosaminidase |
| MA04344 | Proteína rica em prolina 5MeD | 98% | EFY96495 | Prot. rica em prolina 5MeD |
| MA01953 | Quitinase [chiMaB4] | 88% | EFZ03909 | Chitinase |
| MA07448 | Glicana 1,3- β -glicosidase [truncada] | 99% | EFZ04095 | GPI-ancorada na parede celular beta-1,3-endoglicanase EgIC |
| MA03131 | Quitinase CHIT42 (<i>chit1</i>) [chiMaA1] | 99% | EFZ01456 | Quitinase |
| MA01263 | Hipotética conservada | 99% | EFY95563 | Prot. do tipo TRI14 |
| MA00808 | Prot. relacionada com precursor Glicoxal oxidase | 99% | EFZ00587 | Put. precursor de Glicoxal oxidase |

Tabela 8. (continuação)

| Nº acesso | Proteína <i>M. anisopliae</i> E6 | Identidade | Nº acesso NCBI | Proteína <i>M. anisopliae</i> ARSEF 23 |
|-----------|---|------------|-------------------|---|
| MA00379 | Hipotética conservada | 99% | EFY96958 | Hipotética MAA_07504 |
| MA07422 | Prot. rica em cisteína | 99% | EFZ04122 | Prot. rica em cisteína |
| MA08132 | Quitinase [chiMaD1] | 96% | EFY96204 | Quitinase 18-15 |
| MA06224 | Hipotética conservada | 99% | EFY96084 | Hipotética MAA_08391 |
| MA04655 | Hipotética conservada | 95% | EFY99452 | GPI-ancorada na parede celular beta-1,3-endoglicanase EglC |
| MA07089 | Hipotética conservada | 92% | EFZ01950 | Malato desidrogenase |
| MA09695 | Protease do tipo subtilisina Pr1B | 98% | EFY96461 | Protease do tipo subtilisina Pr1B |
| MA09715 | Hipotética conservada | 98% | EFY96442 | Hipotética MAA_08149 |
| MA02991 | Carboxipeptidase | 99% | EFZ04259 | Carboxipeptidase |
| MA03561 | Provável Aldose 1-epimerase | 95% | EFZ02277 | Prot. da biossíntese de diftamida 1 |
| MA10205 | Hipotética conservada | 98% | EFY96697 | Precursor de Endo-N-acetil-beta-D- glicosaminidase |
| MA09595 | Homóloga à N,O- diacetilmuramidase | 100% | EFY94074 | Putativa N,O-diacetil muramidase |
| MA00937 | N,O-diacetilmuramidase não caracterizada | 99% | EFZ04382 | Putativa N,O-diacetil muramidase |
| MA05482 | Hipotética conservada | 99% | EFY99708 | Prot. secretada |
| MA01239 | Hipotética conservada | 97% | EFY94311 | Hipotética MAA_10216 |
| MA03974 | Hipotética | 99% | EFY98111 | Hipotética MAA_06220 |

^aNúmero de acesso do banco de dados SABIA (Almeida *et al.*, 2004).

^bProteína identificada de acordo com o banco de dados SABIA (Almeida *et al.*, 2004).

6. DISCUSSÃO

Metarhizium anisopliae é um fungo entomopatôgeno amplamente utilizado e estudado, porém ainda existem muitas lacunas para elucidar as interações entre este fungo e os seus hospedeiros artrópodes. Por este motivo faz-se necessário compreender o processo de infecção deste fungo em seus hospedeiros através de uma análise genômica funcional, caracterizando genes e proteínas essenciais para a patogenicidade. Para isso, neste trabalho foram utilizadas diferentes abordagens proteômicas para identificar proteínas secretadas de *M. anisopliae* que possam estar envolvidas no processo de infecção.

No presente trabalho, um fator que deve ser levado em consideração é a disponibilização do genoma de *M. anisopliae*. Somente no início deste ano, Gao *et al.* (2011) seqüenciaram os genomas de *M. anisopliae* (linhagem ARSEF23) e *M. acridum* (linhagem CQMa 102), porém existem discussões quanto a classificação da linhagem ARSEF23, visto que uma recente revisão taxonômica classifica-o como *M. robertsii* (Bischoff *et al.*, 2009). O nosso grupo juntamente com a Unidade Genômica do Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC) está desde 2010, em fase de anotação do genoma de *M. anisopliae* linhagem E6, o que possibilitou utilizar estes dados para as comparações e identificações deste trabalho.

Neste trabalho, o fungo *M. anisopliae* foi cultivado em três diferentes fontes de carbono: (i) em presença de glicose representando uma condição de repressão catabólica onde vários dos genes sugeridos como participantes do processo de infecção estão reprimidos (Bogo *et al.*, 1998; Screen *et al.*, 2001; Krieger *et al.*, 2003); (ii) em presença de quitina mimetizando as condições de infecção em cutículas de hospedeiros artrópodes (da Silva *et al.*, 2005; Baratto *et al.*, 2006); e (iii) em presença de GlcNAc que induz o sistema quitinolítico do fungo *M. anisopliae* (Krieger *et al.*, 2003; da Silva *et al.*, 2005; Baratto *et al.*, 2006). Os sobrenadantes destas culturas foram avaliados através de eletroforeses uni e bidimensionais (1-D e 2-D), seguidas de identificação por MS. Estes experimentos foram importantes para a padronização das análises proteômicas deste organismo.

Na análise dos géis bidimensionais (2-D) de sobrenadantes de cultivos de *M. anisopliae* foi detectada uma variedade em número, tamanho e intensidade de *spots* (proteínas) entre as duas condições comparadas, glicose e quitina. Nas comparações dos géis 2-D foi possível observar diferenças no tamanho da massa molecular (kDa) e no ponto isoelétrico (pI) das proteínas selecionadas para as identificações, sendo que ambas condições apresentaram maior concentração de *spots* em pI ácido, entre 4,8 a 6,4. Para as identificações, foram selecionados *spots* diferencialmente expressos entre estas duas condições. Dezesesseis *spots* foram selecionados para identificações por MS (9 *spots* da condições glicose e 6 *spots* da condição quitina) e as comparações com bancos de dados de seqüências de aminoácidos permitiu a identificação de 14 proteínas secretadas de *M. anisopliae*. Estas análises permitiram a identificação de proteínas possivelmente envolvidas na morfogênese do fungo (como as proteínas: glicosil hidrolase e SnodProt1) e na nutrição do fungo (como as proteínas: protease semelhante à tripsina, protease tripsina e protease do tipo subtilisina Pr1D). Algumas proteínas identificadas possivelmente também atuam no processo de infecção do fungo em seus hospedeiros artrópodes, como as proteínas: SnodProt1, quitinase CHIT30, DNase 1, protease semelhante à tripsina, protease tripsina e protease do tipo subtilisina Pr1D. Somente sete proteínas identificadas provenientes dos sobrenadantes destes dois cultivos (glicose e quitina) ainda não possuem funções definidas.

Para os géis unidimensionais (1-D) foram utilizados sobrenadantes de cultivo de *M. anisopliae* em presença de baixas concentrações de GlcNAc. Dezesete regiões foram selecionadas para identificação por MS, com massas moleculares observadas variando entre 20,0 kDa e 50,0 kDa. Através de comparações com bancos de dados foi possível identificar 30 proteínas secretadas de *M. anisopliae*. As identificações destes géis 1-D possibilitaram a identificação de proteínas possivelmente envolvidas na nutrição do fungo (como as proteínas: protease do tipo subtilisina Pr1B, protease tripsina e carboxipeptidase), na morfogênese (como as proteínas: glicana 1,3- β -glicosidase, quitinase CHIT42, proteína relacionada com precursor glicoxal oxidase, homóloga à manosil-oligossacarídeo α -1,2-manosidase e N-acetil-beta-glicosaminidase), na defesa (como as proteínas: proteína rica em cisteína, homóloga à N,O-diacetilmuramidase e N,O-diacetilmuramidase não caracterizada) e no metabolismo do fungo (como a proteína: provável aldose 1-epimerase). Algumas

proteínas identificadas provenientes do sobrenadante de cultivos de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc podem estar potencialmente envolvidas na patogênese do fungo, como as proteínas: quitinase chiMaB4, protease do tipo subtilisina Pr1B e a proteína rica em prolina 5MeD. Somente dezesseis proteínas identificadas oriundas destas análises unidimensionais não possuíram funções definidas.

A Figura 17 ilustra as proteínas identificadas de *M. anisopliae* conforme seu envolvimento com o fungo, sendo relacionado com metabolismo, defesa, nutrição, morfogênese e/ou patogênese.

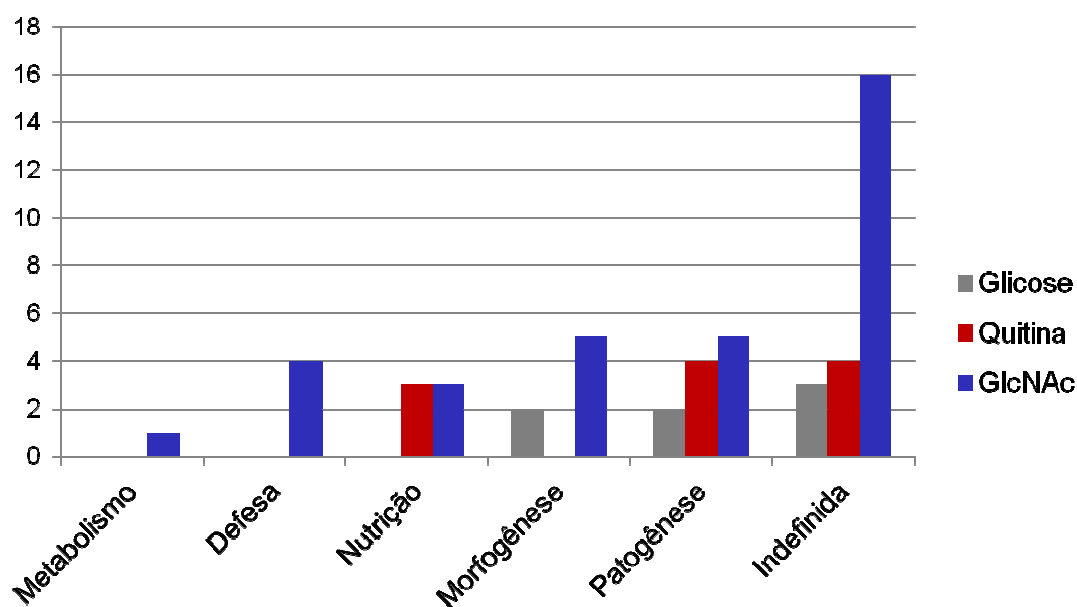


Figura 17. Classificação das proteínas identificadas de *M. anisopliae* conforme seu envolvimento com o fungo. Barra Cinza: Proteínas identificadas em géis de cultivo de *M. anisopliae* na presença de glicose. **Barra Vermelha:** Proteínas identificadas em géis de cultivo de *M. anisopliae* na presença de quitina. **Barra Azul:** Proteínas identificadas em géis de cultivo de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc.

A proteína identificada como provável aldose 1-epimerase (MA03561) possui provável atuação no metabolismo do fungo. As Aldoses 1-epimerases ou mutarotases são enzimas chave do metabolismo de carboidratos, sendo responsáveis pela interconversão anomérica de açúcares nas formas α e β , como glicose e galactose, e pela

manutenção do equilíbrio destes açúcares (Timson & Reece, 2003). Além disso, antigamente trabalhava-se com a hipótese de que estas enzimas podem desempenhar um papel no transporte de glicose entre as células (Keston, 1954). No presente trabalho foi possível identificar experimentalmente a proteína provável aldose 1-epimerase, não havendo descrição anteriormente para *M. anisopliae*.

As proteínas homóloga à N,O-diacetilmuramidase (MA09595) e N,O-diacetilmuramidase não caracterizada (MA00937) possuem provável atuação na defesa do fungo. Estas proteínas possuem ação antibacteriana (Gillespie *et al.*, 2000), através da degradação da parede celular bacteriana (Manczinger *et al.*, 2002). No presente trabalho foi possível identificar experimentalmente estas proteínas não havendo descrição anteriormente para *M. anisopliae*.

A proteína rica em cisteína (MA07422) tem provável atuação na proteção do fungo, pois possui características antimicrobianas, desempenhando um papel importante na proteção das plantas contra infecções microbianas (Osborn *et al.*, 1995; Tailor *et al.*, 1997), sendo reconhecida nas interações fungo-planta (Templeton *et al.*, 1994). Para o fungo *Fusarium oxysporum* esta proteína foi avirulenta em tomates, pois quando secretada no xilema ela acionou o mecanismo de defesa da planta (Rep *et al.*, 2004). No presente trabalho foi possível identificar experimentalmente esta proteína que não possuía descrição anterior para *M. anisopliae*.

A proteína identificada como glicana 1,3- β -glicosidase [truncada] (MA07448) possui provável atuação na defesa e/ou na morfogênese do fungo. O polissacarídeo 1,3- β -glicana é o principal componente estrutural da parede celular de células fúngicas (Brown & Gordon, 2003; Latgé, 2007) e juntamente com a quitina, confere ao fungo rigidez (Gastebois *et al.*, 2009). Acredita-se que o fungo evita o reconhecimento do sistema imune de seus hospedeiros, camuflando ou modificando suas β -glicanas (Brown & Gordon 2003). Como a parede celular fúngica é formada de 1,3- β -glicana, a proteína glicana 1,3- β -glicosidase estaria envolvida em eventos de morfogênese do fungo, como na formação de esporos (Cho, 2006) e no remodelamento da parede celular (Hartl *et al.*, 2010). Além disso, esta proteína possui sinal de âncora de GPI (glicofosfatidilinositol) indicando um vínculo com a membrana plasmática, sugerindo um possível envolvimento desta no remodelamento da parede celular fúngica. Alguns fungos

utilizam estas enzimas para a degradação da parede celular de outros fungos, como o fungo micopatógeno *Trichoderma atroviride* que possui a proteína glicana 1,3- β -glicosidase (GLUC78) fortemente antifúngica contra uma ampla gama de fungos (Donzelli *et al.*, 2001). Manalil *et al.* (2010) já haviam identificado em géis 2-D de sobrenadante de cultivos de *M. anisopliae* na presença da cutícula de *Dermolepida albohirtum*, uma proteína homóloga a proteína 1,3 beta-exoglicanase de *Aspergillus oryzae*.

A proteína identificada como homóloga à manosil-oligossacarídeo α -1,2-manosidase (MA03305) possui provável atuação na morfogênese do fungo. Esta proteína é conhecida por desempenhar um papel importante no processamento de glicanos contendo manose. Em *Aspergillus fumigatus* transformantes deletados para o gene *msdS*, que codifica a proteína α -1,2-manosidase, tiveram alterações na polarização e na septação do fungo nas fases de germinação, crescimento da hifa e conidiação (Li *et al.*, 2008). No presente trabalho foi possível identificar experimentalmente esta proteína, não havendo descrição anteriormente para *M. anisopliae*.

A proteína N-acetil-beta-glicosaminidase (Nag1) (MA04771) possui provável atuação na morfogênese do fungo. Transformantes nulos para o gene *nag1* de *Trichoderma atroviride* afetaram a indução do sistema quitinolítico (Brunner *et al.*, 2003), sugerindo que a enzima N-acetil-beta-glicosaminidase é essencial para desencadear a expressão das quitinases (Brunner *et al.*, 2003; Benitez *et al.*, 2004). Porém, transformantes com deleção dupla para os genes *nag1* e *nag2* de *Trichoderma atroviride* não proporcionaram alteração morfológica ou redução no micoparasitismo (López-Mondéjar *et al.*, 2009), propondo que estas enzimas são responsáveis apenas pela etapa final da degradação da quitina. Alguns trabalhos sugerem um papel desta enzima na morfogênese do fungo, através do remodelamento da parede celular fúngica (López-Mondéjar *et al.*, 2009), da reciclagem de oligômeros de quitina (Li *et al.*, 2005) e da degradação de oligômeros de quitina durante a autólise (Reyes *et al.*, 1989). Manalil *et al.* (2010) já haviam identificado a proteína N-acetil glicosaminidase em géis 2-D de sobrenadantes de cultivos de *M. anisopliae* na presença da cutícula de *Dermolepida albohirtum*.

A proteína identificada como glicosil hidrolase (MA06844) também possui provável atuação na morfogênese do fungo. Isso se deve ao fato de que a parede celular

de fungos é composta basicamente de manana, quitina e glucana (Smits *et al.*, 2001; Adams, 2004; Latgé, 2007), e as mananases são enzimas que hidrolizam a cadeia de mananas presentes na parede celular fúngica (Zhang *et al.*, 2007), indicando que esta proteína pode atuar na morfogênese do fungo. Outro indicativo é a presença de sinal de âncora de GPI, possibilitando um possível ancoramento desta proteína na parede celular da célula fúngica. No presente trabalho foi possível identificar experimentalmente esta proteína, não havendo descrição anteriormente para *M. anisopliae*.

A proteína relacionada com precursor glioxal oxidase (MA00808) possui provável papel na morfogênese e/ou na patogênese do fungo. A proteína glioxal oxidase de *Phanerochaete chrysosporium* atua como componente da via de degradação da lignina (Kersten & Witek, 1995). O gene *glol* que codifica a proteína glioxal oxidase de *Ustilago maydis*, é necessário para o desenvolvimento da patogenicidade, produção de H₂O₂ (Peróxido de hidrogênio), manutenção da morfologia celular e o crescimento de filamentos (Leuthner *et al.*, 2005). Em *Cryptococcus neoformans* o gene que codifica a proteína glioxal oxidase foi regulado em condições de crescimento a 37°C e hipóxia, concluindo que este gene possivelmente possui um papel na virulência da levedura (Rosa e Silva *et al.*, 2008). A função para a proteína glioxal oxidase ainda não está completamente definida. No presente trabalho foi possível identificar experimentalmente esta proteína que até então não era descrita para *M. anisopliae*.

A proteína SnodProt1 (MA10328) também possui provável papel na morfogênese e/ou na patogênese do fungo. Esta proteína é membro de uma família de fungos específica de pequenas proteínas secretadas (Jeong *et al.*, 2007), que em geral provocam um série de respostas de seus hospedeiros indicativas de danos celulares, como fitotoxicidade (Pazzagli *et al.*, 1999; Jeong *et al.*, 2007), podendo estar envolvidas também na morfogênese da parede celular (Seidl *et al.*, 2006). Em *Magnaporthe grisea* transformantes deletados para a proteína homóloga a Snodprot1 (MSP1) não mostraram efeitos no crescimento vegetativo e na formação de apressório, mas a virulência em plantas suscetíveis foi reduzida (Jeong *et al.*, 2007). Além disso, esta proteína também apresentou o domínio Endoglicanase *Barwin-related* (Nº acesso Interpro: IPR009009), envolvido com a parede celular de plantas (Seidl *et al.*, 2006). Com base na categorização biológica do *Gene ontology* esta proteína também está envolvida na interação com o hospedeiro através do sistema de secreção do tipo II. Neste presente

trabalho foi possível identificar experimentalmente a proteína SnodProt1, sendo que esta não havia sido descrita anteriormente para *M. anisopliae*.

As proteases do tipo subtilisina Pr1B (MA09695) e do tipo subtilisina Pr1D (MA09188) também foram identificadas e possuem provável atuação na patogênese e/ou na nutrição do fungo. As proteases Pr1 são possivelmente determinantes na patogenicidade do fungo (Goettel *et al.*, 1989; Gillespie *et al.*, 1998; Castellanos-Moguel *et al.*, 2007), em virtude da sua habilidade para hidrolisar diferentes tipos de cutículas (Gillespie *et al.*, 1998) e também da localização ultraestrutural de Pr1 durante a penetração *in vivo* de *M. anisopliae* (linhagem ME1) na cutícula de *Manduca sexta* (Goettel *et al.*, 1989). Em *M. anisopliae* as proteases do tipo Pr1 atuam na invasão de seus hospedeiros artrópodes através da degradação de suas cutículas (Goettel *et al.*, 1989; Gillespie *et al.*, 1998; Castellanos-Moguel *et al.*, 2007). Santi *et al.* (2010) concluem que diferentes proteases Pr1 podem estar envolvidas nos estágios iniciais da infecção, reconhecendo o hospedeiro e desencadeando a infecção. Alguns autores concluíram que as proteases Pr1 também podem atuar no fornecimento de nutrientes para o fungo (St. Leger *et al.*, 1996c; Bagga *et al.*, 2004). O gene *pr1b*, que codifica a protease do tipo subtilisina Pr1B de *M. anisopliae*, foi identificado durante o crescimento de *M. anisopliae* em cutículas de *Blattaria giganteus* (Joshi *et al.*, 1997), mostrando que este gene possivelmente está envolvido no processo de infecção do fungo. Linhagens de *M. anisopliae* deficientes do gene *pr1b* mostraram-se infectivas, porém com a virulência reduzida contra *Tenebrio molitor* (Wang *et al.*, 2002). Manalil *et al.* (2010) já haviam identificado a protease do tipo subtilisina Pr1D em géis 2-D de sobrenadantes de cultivos de *M. anisopliae* na presença da cutícula de *Dermolepida albohirtum*.

A proteína identificada como carboxipeptidase (MA02991) também possui provável atuação na patogênese e/ou na nutrição do fungo. Esta proteína é secretada por *M. anisopliae* durante seu crescimento no hospedeiro e está envolvida na degradação de peptídeos para nutrição do fungo (St. Leger, 1994). Acredita-se que esta complementa a atividade das proteases Pr1 na patogênese do fungo (St. Leger, 1994; Manalil *et al.*, 2010). Nos trabalhos de Santi *et al.* (2009), Santi *et al.* (2010) e Manalil *et al.* (2010) a proteína carboxipeptidase já havia sido identificada em géis 2-D de sobrenadantes de

cultivos de *M. anisopliae* na presença de cutículas de *Rhipicephalus microplus*, *Dysdercus peruvianus* e *Dermolepida albohirtum*.

As tripsinas: protease tripsina (MA02007) e a protease semelhante à tripsina (*try1*) (MA09286), também foram identificadas e possuem provável atuação na patogênese e/ou na nutrição do fungo. Estas enzimas são capazes de degradar proteínas da parede celular (St. Leger *et al.*, 1987; St. Leger *et al.*, 1996a; Carlile *et al.*, 2000; Suarez *et al.*, 2004), para penetração na cutícula do hospedeiro e/ou nutrição do fungo (St. Leger *et al.*, 1996a). Localizam-se na parede celular de fungos durante seu crescimento na cutícula do hospedeiro artrópode (St. Leger *et al.*, 1996a). Alguns trabalhos sugerem que estas proteínas estariam presentes nos primeiros estágios de colonização da cutícula do hospedeiro (St. Leger *et al.*, 1996a; Manalil *et al.*, 2010), ou seja, nos primeiros estágios do processo infeccioso (St. Leger *et al.*, 1996a; Santi *et al.*, 2010). Acredita-se que as tripsinas complementam a atividade das proteases Pr1 atuando sinergicamente em uma cascata de reações na cutícula do hospedeiro, a fim de facilitar a penetração (St. Leger *et al.*, 1996a; Bindschedler *et al.*, 2003). Murad *et al.* (2008) e Manalil *et al.* (2010) já haviam identificado em géis 2-D de sobrenadantes de culturas de *M. anisopliae* em presença de *Callosobruchus maculatus* e *Dermolepida albohirtum*, proteases semelhante a tripsina.

Foi identificada também a proteína DNase 1 (MA06273) que possui possível atuação na patogênese do fungo. Esta proteína possui habilidade de degradar DNA de fita dupla ou simples (Greenwell *et al.* 2008). Para o protozoário *Tritrichomonas foetus* esta proteína desempenha um papel na patogenicidade e na adesão (Greenwell *et al.* 2008). Segundo Santi *et al.* (2010) a DNase pode ser uma importante proteína para a infecção de *M. anisopliae* em *Rhipicephalus microplus* e *Dysdercus peruvianus*. Santi *et al.* (2010) já haviam identificado em géis 2-D de sobrenadantes de cultivos de *M. anisopliae* em presença de cutículas de *Rhipicephalus microplus* e *Dysdercus peruvianus*, a proteína DNase1.

A proteína rica em prolina 5MeD (MA04344) também foi identificada e possui provável participação na patogênese do fungo. Em plantas, esta proteína pode desempenhar várias funções, incluindo interações proteína-proteína e resposta a uma ampla gama de *stress* ambientais (He *et al.*, 2002; Szabados & Savouré, 2010; Stein *et*

al., 2011), incluindo privação de água, salinidade, mudança de temperatura, infecção de patógenos, toxicidade a metal pesado, anaerobiose, deficiência de nutrientes, poluição atmosférica e radiação UV (Hare & Cress, 1997; Kishor *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 2011). Em fungos, esta proteína impede a morte celular programada (apoptose), inibindo as respostas ao estresses induzidas por apoptose, e atuando como um anti-oxidante na diminuição dos níveis intracelulares de ROS (Espécies reativas de oxigênio) (Chen & Dickman, 2005; Szabados & Savouré, 2010). Possivelmente estas proteínas desempenham um papel de co-reguladores de patogenicidade, não atuando diretamente na infecção (Freimoser *et al.*, 2005). Santi *et al.* (2009) a partir de géis bidimensionais de sobrenadantes de cultivos de *M. anisopliae* na presença de *Rhipicephalus microplus*, já haviam identificado a proteína rica em prolina 5MeD.

A proteína homóloga à aorsina (MA02966) ainda não possui função caracterizada para o fungo *M. anisopliae*. As proteases do tipo serino alcalina, são ativas e estáveis em pH alcalino, este grupo de enzimas possuem muitas aplicações comerciais, como: na indústria de detergentes e farmacêutica; no processamento de alimentos, recuperação de prata, couro; além disso estas enzimas desempenham um importante papel nos processos metabólicos celulares (Ma *et al.*, 2007; Tremacoldi *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2011). Provavelmente as proteases do tipo serino alcalina estão relacionadas com a patogenicidade do fungo (Santi *et al.*, 2010), porém sua função ainda não está elucidada. Manalil *et al.* (2010) através de géis 2-D de sobrenadantes de culturas de *M. anisopliae* na presença da cutícula de *Dermolepida albohirtum*, haviam identificado uma protease predita do tipo serino alcalina de *Aspergillus oryzae*.

A proteína homóloga à tripeptidil-peptidase 1 (MA01092) também ainda não possui função caracterizada para o fungo *M. anisopliae*. Em *Beauveria bassiana* a proteína tripeptidil peptidase (Bb TPP) mostrou ser mais expressa durante a infecção de larvas de *Manduca sexta* (Tartar & Boucias, 2004), sua função ainda não foi caracterizada, porém provavelmente está envolvida com a patogênese do fungo. No presente trabalho foi possível identificar experimentalmente a proteína homóloga à tripeptidil-peptidase 1, não havendo descrição anteriormente para *M. anisopliae*.

As quitinases foram identificadas nas condições quitina e GlcNAc. Nos géis 2-D de proteínas secretadas de cultivos de *M. anisopliae* na presença de quitina foi possível

identificar a quitinase CHIT30 (MA02097) e nos géis 1-D de proteínas secretadas de cultivos de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc foi possível identificar três quitinases: a quitinase CHIT42 (MA03131), a quitinase chiMaB4 (MA01953) e a quitinase chiMaD1 (MA08132).

A quitinase CHIT42 (*chit1*) [chiMaA1] possui provável atuação na morfogênese e/ou nutrição do fungo. Baratto *et al.* (2003), já haviam expressado e caracterizado esta quitinase em *E. coli*, e sugeriram que esta proteína possui atividade de endoquitinase e atua no processo de nutrição e no crescimento celular do fungo. Bogo *et al.* (1998) já haviam isolado o gene *chit1* que codifica esta quitinase, possuindo 3 íntrons e uma ORF de 1.521bp. A superexpressão deste gene *chit1* não alterou a virulência do fungo *M. anisopliae* (linhagem 2575) na lagarta *Manduca sexta* (Screen *et al.*, 2001), porém Baratto *et al.* (2003) avaliaram que a superexpressão do gene *chit1* aumenta os níveis de atividade quitinolítica em *M. anisopliae* (linhagem E6). Seidl *et al.* (2005) em sua nova classificação das GH18, agrupou esta quitinase filogeneticamente mais próxima com a quitinase chi18-5 de *Hypocrea jecorina*, classificando-a como pertencente ao subgrupo A, que tem provável atuação na morfogênese do fungo.

A quitinase CHIT30 (*chi3*) [chiMaB2] possui atuação na morfogênese do fungo *M. anisopliae*. Pinto *et al.* (1997) já haviam caracterizado esta quitinase a partir de sobrenadantes de cultivos de *M. anisopliae* (linhagem E6) em presença de quitina, evidenciando que a CHIT30 possui atividades de endo e exoquitinase. Da Silva *et al.* (2005) comprovou a expressão desta proteína durante a infecção de *R. microplus*, e identificou o gene *chi3* que codifica a quitinase CHIT30, possuindo 1 íntron e uma ORF de 1.010bp. Transformantes nulos para o gene *chi3* foram construídos no trabalho de Staats (2007), e o fungo *M. anisopliae* teve menor virulência contra *D. peruvianus* e menor tolerância quando exposto ao choque térmico (altas temperaturas 42°C). Seidl *et al.* (2005) em sua nova classificação das GH18, agrupou esta quitinase filogeneticamente mais próxima com a quitinase chi18-13 de *Hypocrea jecorina*, classificando esta quitinase no subgrupo B, com provável atuação na patogênese do fungo.

No trabalho de Junges (2010), foi realizada a análise *in silico* das quitinases do genoma de *M. anisopliae* (linhagem E6) através de comparação com genomas de organismos ortólogos, e foi verificado que além dos três genes já caracterizados deste

organismo (*chit1*, *chi2* e *chi3*), existiam outras 20 ORFs de quitinases putativas. No presente trabalho foi possível identificar experimentalmente duas novas quitinases de *M. anisopliae*: a quitinase chiMaB4 (MA01953) e a quitinase chiMaD1 (MA08132).

A quitinase chiMaB4 (MA01953) possui um domínio de ligação à celulose (CBD, N° Interpro: IPR000254) localizado na região C-terminal da proteína. Este domínio CBD pode ser encontrado em enzimas que degradam outros polissacarídeos e não apenas celulose (Kim *et al.*, 2002). A adição do domínio CBD na quitinase Chit42 de *Trichoderma harzianum* aumentou sua atividade hidrolítica em substratos insolúveis, como quitina de solo ou parede celular fúngica rica em quitina, sendo então provável que a presença deste domínio auxilia na degradação da quitina durante o micoparasitismo (Limón *et al.*, 2001; Limón *et al.*, 2004; Seidl *et al.*, 2005). Junges (2010) através de comparações com quitinases ortólogas, agrupou esta quitinase como sendo filogeneticamente mais próxima da quitinase chi18-12 (Chit33) de *Hypocrea jecorina*. A quitinase chi18-12 (Chit33) pode ser induzida por quitina, parede celular de fungos e monômeros de carbono (N-acetilglicosamina) (Limón *et al.*, 1995; De las Mercedes Dana *et al.*, 2001; Markovich & Kononova, 2003). Transformantes superexpressos para o gene *chit33* de *Trichoderma harzianum* tiveram sua atividade de quitinase aumentada, inibindo o crescimento de *Rhizoctonia solani* (Limón *et al.*, 1999). Em alguns trabalhos, as características da quitinase chi18-12 (Chit33) sugerem um papel nutricional (saprófita ou micoparasitismo) (Limón *et al.*, 1995; De las Mercedes Dana *et al.*, 2001). A quitinase chiMaB4 está classificada no subgrupo B, e segundo Seidl (2008) quitinases deste subgrupo possuem provável atuação na patogênese do fungo. Através de RT-PCR, nosso grupo está realizando análises transcricionais das quitinases putativas do genoma de *M. anisopliae*, anteriormente propostas por Junges (2010), sob diferentes condições de cultivo. Resultados preliminares mostraram a presença de transcritos de chiMaB4 na condição de GlcNAc 0,25%, concordando com a identificação desta proteína em géis de *M. anisopliae* em presença de GlcNAc 0,25%.

Junges (2010) através de comparações com quitinases ortólogas, agrupou a quitinase chiMaD1 (MA08132) como sendo filogeneticamente mais próxima da quitinase chi18-15 (Chit36) de *Hypocrea jecorina*, classificando-se no subgrupo D. As quitinases do subgrupo D ainda não possuem função definida. A quitinase chi18-15 (Chit36) possui atividade de endoquitinase (Cruz *et al.*, 1992; Viterbo *et al.*, 2002), e

pode ser induzida em condições de estresse osmótico, privação de nitrogênio, na presença de *Rhizoctonia solani*, quitina coloidal e N-acetilglicosamina (Viterbo *et al.*, 2002; Baranski *et al.*, 2008). Transformantes superexpressando o gene *chit36* de *Trichoderma harzianum* inibem a germinação do esporo e o crescimento fúngico de *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfii* e *Alternaria alternata* (Viterbo *et al.*, 2001; Viterbo *et al.*, 2002; Baranski *et al.*, 2008), inibindo assim o desenvolvimento de patógenos fúngicos. Resultados preliminares de RT-PCR do nosso grupo, mostraram também a presença de transcritos de *chiMaD1* na condição de GlcNAc 0,25%, concordando com a identificação do presente trabalho.

Neste trabalho foram utilizadas proteínas extraídas de sobrenadantes de cultivos de *M. anisopliae*. Por esta razão, na maioria das proteínas identificadas (32 proteínas) foi observado um peptídeo-sinal na região amino-terminal (N-terminal), visualizado através de ferramentas de predição. Porém, seis proteínas identificadas não apresentaram peptídeo-sinal, como: a proteína hipotética conservada (MA10205), a proteína hipotética conservada (MA04655), a homóloga à manosil-oligossacarídeo α -1,2-manosidase (MA03305), a protease tripsina (MA02007), a carboxipeptidase (MA02991) e a proteína hipotética (MA03974), provavelmente estas proteínas são contaminantes de célula lisadas.

Porém, um dos fatores que deve ser levado em consideração é de que alguns autores afirmam a existência de outras formas de secreção, como por exemplo, através do transporte vesicular. Estas vesículas secretoras atravessariam a parede celular (Rodrigues *et al.*, 2007), possibilitando o transporte de proteínas, lipídios, carboidratos e componentes para o ambiente extracelular (Rodrigues *et al.*, 2008). Estas vesículas transportadoras já foram encontradas em *Cryptococcus neoformans* contendo numerosas moléculas associadas com a sobrevivência e patogenicidade do fungo (Rodrigues *et al.*, 2008).

Algumas proteínas identificadas possivelmente sofreram algum tipo de modificação pós-traducional, que altera a massa molecular e/ou o pI, visto que em algumas proteínas a massa molecular e o pI teóricos eram significativamente distintos da massa molecular e do pI experimentalmente observados. Além disso, também foi observado que em alguns casos, a mesma proteína foi identificada em diferentes regiões

e *spots* do mesmo gel. Essas variações ou isoformas podem ser atribuídas a importantes modificações pós-traducionais, que alteram as propriedades destas proteínas através de clivagem proteolítica ou por adição de um grupo de modificação ou mais aminoácidos (Mann & Jensen, 2003). Porém, experimentos adicionais com análise detalhada dos espectros devem ser realizados para afirmarmos a ocorrência das modificações pós-traducional e quais foram estas modificações.

Neste trabalho foi possível observar e analisar diferenças na expressão de proteínas secretadas pelo fungo *M. anisopliae* a partir de diferentes cultivos, gerando informações importantes sobre proteínas envolvidas no processo de infecção do fungo, na morfogênese, na nutrição, na defesa e no metabolismo celular. Também foi possível identificar algumas proteínas que ainda não eram descritas para este organismo, bem como a identificação experimental de duas novas quitinases propostas pela análise *in silico* do genoma de *M. anisopliae*.

7. CONCLUSÕES

- ✓ As análises proteômicas permitiram a identificação de 38 proteínas secretadas do fungo *M. anisopliae* E6.

- ✓ Na validação das quitinases, foi possível identificar experimentalmente duas novas quitinases, a quitinase chiMaD1 e a quitinase chiMaB4, que haviam sido preditas pela análise *in silico* do genoma de *M. anisopliae* E6. Sendo que a quitinase chiMaB4 tem provável atuação na patogênese e/ou na nutrição do fungo e a quitinase chiMaD1 tem provável atuação na morfogênese e/ou na defesa do fungo.

- ✓ Sete proteínas identificadas neste trabalho já haviam sido descritas por outros autores como sendo envolvidas no processo de infecção do fungo, estas proteínas são: DNase 1 (MA06273), protease semelhante a tripsina (*try1*) (MA09286), protease do tipo subtilisina Pr1D (MA09188), protease tripsina (MA02007), carboxipeptidase (MA02991), proteína rica em prolina 5MeD (MA04344), quitinase CHIT30 (*chi3*) [chiMaB2] (MA02097).

- ✓ Algumas proteínas identificadas no presente trabalho ainda não haviam sido descritas para o organismo *M. anisopliae*, sendo estas: proteínas que possivelmente atuam na defesa do fungo (homóloga à N,O-diacetilmuramidase e a proteína N,O-diacetilmuramidase não caracterizada); proteínas com provável atuação na morfogênese do fungo (homóloga à manosil-oligossacarídeo α -1,2-manosidase, a proteína glicosil hidrolase, a proteína relacionada com precursor glioxal oxidase e a proteína SnodProt 1); proteínas com possível atuação na patogênese do fungo (a proteína SnodProt 1 e a quitinase chiMaB4); proteína com atuação no metabolismo do fungo (a provável proteína aldose 1-epimerase); e algumas proteínas que ainda não possuem funções estabelecidas (como as proteínas: homóloga à tripeptidil-peptidase 1 e a quitinase chiMaD1).

- ✓ Para realizar comparações entre os cultivos, outras análises e experimentos devem ser realizados e padronizados para que se tenha resultados conclusivos.

- ✓ Estes experimentos foram importantes para a padronização das análises proteômicas para este organismo, e para a identificação de novas proteínas secretadas.

8. PERSPECTIVAS

- ✓ Melhorar as amostras de cultivos para os géis de zimogramas de quitinases;
- ✓ Realizar géis bidimensionais de atividade quitinolítica de cultivos de *M. anisopliae* (Khan *et al.*, 2003);
- ✓ Utilizar uma coluna de purificação com quitina cristalina para obter quitinases de *M. anisopliae*;
- ✓ Realizar análises proteômicas comparativas de géis bidimensionais das condições testadas e ainda uma condição com cutícula do hospedeiro, com a faixa de pH 4-7, visto que neste trabalho esta faixa concentrou o maior número de proteínas;
- ✓ Realizar a identificação multidimensional do extrato total (MudPIT) de proteínas secretadas por cultivos de *M. anisopliae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abergel, C., Bouveret, E., Claverie, J. M., Brown, K., Rigal, A., Lazdunski, C. & Bénédicti, H. (1999). Structure of the *Escherichia coli* TolB protein determined by MAD methods at 1.95 Å resolution. *Structure* **7**, 1291-1300.
- Adams, D. J. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* **150**, 2029.
- Almeida, L. G. P., Paixão, R., Souza, R. C., Da Costa, G. C., Barrientos, F. J. A., Dos Santos, M. T., De Almeida, D. F. & Vasconcelos, A. T. R. (2004). A system for automated bacterial (genome) integrated annotation SABIA. *Bioinformatics* **20**, 2832.
- Alves, S. B. (1998). Fungos entomopatogênicos. In: *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, **2**, 289-381.
- Ansari, M., Vestergaard, S., Tirry, L. & Moens, M. (2004). Selection of a highly virulent fungal isolate, *Metarhizium anisopliae* CLO 53, for controlling *Hoplia philanthus*. *Journal of invertebrate pathology* **85**, 89-96.
- Arruda, W., Lübeck, I., Schrank, A. & Vainstein, M. H. (2005). Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology* **37**, 231-244.
- Bagga, S., Hu, G., Screen, S. E. & St Leger, R. J. (2004). Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene* **324**, 159-169.
- Baranski, R., Klocke, E. & Nothnagel, T. (2008). Chitinase CHIT36 from *Trichoderma harzianum* enhances resistance of transgenic carrot to fungal pathogens. *Journal of Phytopathology* **156**, 513-521.

- Baratto, C. M., Vanusa, S. M., Santi, L., Passaglia, L., ISilveira, S., MHenning, V. & Schrank, A. (2003).** Expression and characterization of the 42 kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. *Canadian journal of microbiology* **49**, 723-726.
- Baratto, C. M., Dutra, V., Boldo, J. T., Leiria, L. B., Vainstein, M. H. & Schrank, A. (2006).** Isolation, characterization, and transcriptional analysis of the chitinase *chi2* gene (DQ011663) from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Current microbiology* **53**, 217-221.
- Barson, G., Renn, N. & Bywater, A. F. (1994).** Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly (*Musca domestica* L.), a pest of intensive animal units. *Journal of invertebrate pathology* **64**, 107-113.
- Bateman, A., Coghill, P. & Finn, R. D. (2010).** DUFs: families in search of function. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* **66**, 1148-1152.
- Benitez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Codón, A.C. (2004).** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* **7**, 249-260.
- Bindschedler, L. V., Sanchez, P., Dunn, S., Mikan, J., Thangavelu, M., Clarkson, J. M. & Cooper, R. M. (2003).** Deletion of the SNP1 trypsin protease from *Stagonospora nodorum* reveals another major protease expressed during infection. *Fungal Genetics and Biology* **38**, 43-53.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A. & Humber, R. A. (2009).** A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* **101**, 512.
- Blanford, S., Chan, B. H. K., Jenkins, N., Sim, D., Turner, R. J., Read, A. F. & Thomas, M. B. (2005).** Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science* **308**, 1638.

- Bogo, M. R., Rota, C. A., Pinto Jr, H., Ocampos, M., Correa, C. T., Vainstein, M. H. & Schrank, A. (1998).** A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Current microbiology* **37**, 221-225.
- Boldo, J. T. (2009).** Estudos da função e regulação do gene CHI2 do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (1883). In: *Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular: Universidade Federal do Rio Grande do Sul*.
- Boldo, J. T., Junges, A., do Amaral, K. B., Staats, C. C., Vainstein, M. H. & Schrank, A. (2009).** Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Current genetics* **55**, 551-560.
- Boldo, J. T., Amaral, K. B., Junges, A., Pinto, P. M., Staats, C. C., Vainstein, M. H. & Schrank, A. (2010).** Evidence of alternative splicing of the *chi2* chitinase gene from *Metarhizium anisopliae*. *Gene* **462**, 1-7.
- Bowe, F., Lipps, C. J., Tsolis, R. M., Groisman, E., Heffron, F. & Kusters, J. G. (1998).** At least four percent of the *Salmonella typhimurium* genome is required for fatal infection of mice. *Infection and immunity* **66**, 3372.
- Broetto, L., Silva, W. O. B., Bailão, A. M., Soares, C. A., Vainstein, M. H. & Schrank, A. (2010).** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: cell-surface localization and role in host adhesion. *FEMS Microbiology Letters* **312**, 101-109.
- Brown, D. W., Proctor, R. H., Dyer, R. B. & Plattner, R. D. (2003).** Characterization of a *Fusarium* 2-gene cluster involved in trichothecene C-8 modification. *Journal of agricultural and food chemistry* **51**, 7936-7944.

- Brown, G. D. & Gordon, S. (2003).** Fungal [beta]-Glucans and Mammalian Immunity. *Immunity* **19**, 311-315.
- Bruck, D. J. (2005).** Ecology of *Metarhizium anisopliae* in soilless potting media and the rhizosphere: implications for pest management. *Biological Control* **32**, 155-163.
- Brunner, K., Peterbauer, C. K., Mach, R. L., Lorito, M., Zeilinger, S. & Kubicek, C. P. (2003).** The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Current genetics* **43**, 289-295.
- Caldwell, S. R., Newcomb, J. R., Schlecht, K. A. & Raushel, F. M. (1991).** Limits of diffusion in the hydrolysis of substrates by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biochemistry* **30**, 7438-7444.
- Carlile, A., Bindschedler, L., Bailey, A., Bowyer, P., Clarkson, J. & Cooper, R. (2000).** Characterization of SNP1, a cell wall-degrading trypsin, produced during infection by *Stagonospora nodorum*. *Molecular plant-microbe interactions* **13**, 538-550.
- Carr, S., Penfold, C. N., Bamford, V., James, R. & Hemmings, A. M. (2000).** The structure of TolB, an essential component of the tol-dependent translocation system, and its protein-protein interaction with the translocation domain of colicin E9. *Structure* **8**, 57-66.
- Castellanos-Moguel, J., González-Barajas, M., Mier, T., del Rocío Reyes-Montes, M., Aranda, E. & Toriello, C. (2007).** Virulence testing and extracellular subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (Pr2) activity during propagule production of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). *Revista iberoamericana de micología* **24**, 62.

- Chen, C. & Dickman, M. B. (2005).** Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 3459.
- Cho, E. M., Liu, L., Farmerie, W. & Keyhani, N. O. (2006).** EST analysis of cDNA libraries from the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. I. Evidence for stage-specific gene expression in aerial conidia, in vitro blastospores and submerged conidia. *Microbiology* **152**, 2843.
- Clarkson, J. M. & Charnley, A. K. (1996).** New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology* **4**, 197-203.
- Cohen-Kupiec, R. & Chet, I. (1998).** The molecular biology of chitin digestion. *Current opinion in biotechnology* **9**, 270-277.
- Cruz, J., Hidalgo Gallego, A., Lora, J. M., Benitez, T., Pintor Toro, J. A. & Llobell, A. (1992).** Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Biochemistry* **206**, 859-867.
- da Silva, M. V., Santi, L., Staats, C. C., da Costa, A. M., Colodel, E. M., Driemeier, D., Vainstein, M. H. & Schrank, A. (2005).** Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Research in microbiology* **156**, 382-392.
- Dave, K. I., Lauriano, C., Xu, B., Wild, J. R. & Kenerley, C. M. (1994).** Expression of organophosphate hydrolase in the filamentous fungus *Gliocladium virens*. *Applied microbiology and biotechnology* **41**, 352-358.
- De las Mercedes Dana, M., Limón, M. C., Mejías, R., Mach, R. L., Benítez, T., Pintor-Toro, J. A. & Kubicek, C. P. (2001).** Regulation of chitinase 33 (*chit33*) gene expression in *Trichoderma harzianum*. *Current genetics* **38**, 335-342.

- Donzelli, B., Lorito, M., Scala, F. & Harman, G. (2001).** Cloning, sequence and structure of a gene encoding an antifungal glucan 1, 3-[beta]-glucosidase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*). *Gene* **277**, 199-208.
- Driver, F., Milner, R. J. & Trueman, J. W. H. (2000).** A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research* **104**, 134-150.
- Duo-Chuan, L. (2006).** Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* **161**, 345-360.
- Fang, W., Pava-ripoll, M., Wang, S. & St Leger, R. (2009).** Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genetics and Biology* **46**, 277-285.
- Frazzon, A. P. G., Vaz Junior, I. S., Masuda, A., Schrank, A. & Vainstein, M. H. (2000).** In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* **94**, 117-125.
- Freimoser, F. M., Hu, G. & Leger, R. J. S. (2005).** Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation *in vitro*. *Microbiology* **151**, 361.
- Funkhouser, J. D. & Aronson, N. N. (2007).** Chitinase family GH 18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 96.
- Gao, Q., Jin, K., Ying, S. H. & other authors (2011).** Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genetics* **7**, e1001264.
- Gastebois, A., Clavaud, C., Aïmanianda, V. & Latgé, J. P. (2009).** *Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization. *Future Microbiology* **4**, 583-595.

- Gietl, C. (1992).** Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. *Biochimica et biophysica acta* **1100**, 217.
- Gillespie, J. P., Bateman, R. & Charnley, A. K. (1998).** Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology* **71**, 128-137.
- Gillespie, J. P., Burnett, C. & Charnley, A. K. (2000).** The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *Journal of Insect Physiology* **46**, 429-437.
- Goettel, M. S., Leger, R. J. S., Rizzo, N. W., Staples, R. C. & Roberts, D. W. (1989).** Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) Cuticle. *Microbiology* **135**, 2233.
- Goward, C. R. & Nicholls, D. J. (1994).** Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* **3**, 1883.
- Greenwell, P., Younes, M. & Rughooputh, S. (2008).** Purification and analysis of DNases of *Trichomonas foetus*: Evidence that these enzymes are glycoproteins. *International journal for parasitology* **38**, 749-756.
- Hajek, A. E., McManus, M. L. & Delalibera Junior, I. (2007).** A review of introductions of pathogens and nematodes for classical biological control of insects and mites. *Biological Control* **41**, 1-13.

- Hamaguchi, T., Ito, T., Inoue, Y., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P. & Ito, K. (2010).** Purification, characterization and molecular cloning of a novel endo- β -N-acetylglucosaminidase from the basidiomycete, *Flammulina velutipes*. *Glycobiology* **20**, 420.
- Hare, P. & Cress, W. (1997).** Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* **21**, 79-102.
- Harris, L., Desjardins, A. E., Plattner, R., Nicholson, P., Butler, G., Young, J., Weston, G., Proctor, R. & Hohn, T. (1999).** Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant Disease* **83**, 954-960.
- Hartl, L., Gastebois, A., Aïmanianda, V. & Latgé, J. P. (2010).** Characterization of the GPI-anchored endo β -1, 3-glucanase Eng2 of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*.
- He, C. Y., Zhang, J. S. & Chen, S. Y. (2002).** A soybean gene encoding a proline-rich protein is regulated by salicylic acid, an endogenous circadian rhythm and by various stresses. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **104**, 1125-1131.
- He, M. & Xia, Y. (2009).** Construction and analysis of a normalized cDNA library from *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* germinating and differentiating on *Locusta migratoria* wings. *FEMS Microbiology Letters* **291**, 127-135.
- Hsiao, Y. & Ko, J. (2001).** Determination of destruxins, cyclic peptide toxins, produced by different strains of *Metarhizium anisopliae* and their mutants induced by ethyl methane sulfonate and ultraviolet using HPLC method. *Toxicon* **39**, 837-841.
- Hu, G. & St Leger, R. J. (2002).** Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and environmental microbiology* **68**, 6383.

- Iseli, B., Armand, S., Boller, T., Neuhaus, J. M. & Henrissat, B. (1996).** Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. *FEBS letters* **382**, 186-188.
- Jeong, J. S., Mitchell, T. K. & Dean, R. A. (2007).** The *Magnaporthe grisea* snodprot1 homolog, MSP1, is required for virulence. *FEMS microbiology letters* **273**, 157-165.
- Joshi, L., St. Leger, R. J. & Roberts, D. W. (1997).** Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (Pr1B) from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using differential display-RT-PCR. *Gene* **197**, 1-8.
- Junges, A. (2010).** *Metarhizium anisopliae*: expressão de proteína tóxica de origem vegetal e análise genômica de quitinases. In: *Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular: Universidade Federal do Rio Grande do Sul*.
- Juárez, M. P., Crespo, R., Fernández, G. C., Lecuona, R. & Cafferata, L. F. R. (2000).** Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a chagas disease vector. *Journal of invertebrate pathology* **76**, 198-207.
- Kaaya, G. P. & Munyinyi, D. M. (1995).** Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. *Journal of invertebrate pathology* **66**, 237-241.
- Kasprzewska, A. (2003).** Plant chitinases-regulation and function. *Cellular and Molecular Biology Letters* **8**, 809-824.
- Kersten, P. J. & Witek, C. (1995).** Phanerochaete chrysosporium glyoxal oxidase is encoded by two allelic variants: structure, genomic organization, and heterologous expression of glx1 and glx2. *Journal of bacteriology* **177**, 6106.
- Keston, A. S. (1954).** Occurrence of mutarotase in animals: Its proposed relationship to transport and reabsorption of sugars and insulin. *Science* **120**, 355.

- Khan, A., Williams, K., Molloy, M. P. & Nevalainen, H. (2003).** Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. *Protein expression and purification* **32**, 210-220.
- Kim, D. J., Baek, J. M., Uribe, P., Kenerley, C. M. & Cook, D. R. (2002).** Cloning and characterization of multiple glycosyl hydrolase genes from *Trichoderma virens*. *Current genetics* **40**, 374-384.
- Kishor, P. B. K., Sangam, S., Amrutha, R. & other authors (2005).** Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr Sci* **88**, 424-438.
- Kramer, K. J., Hopkins, T. L. & Schaefer, J. (1995).** Applications of solids NMR to the analysis of insect sclerotized structures. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **25**, 1067-1080.
- Krieger, M. C., Schrank, A. & Vainstein, M. H. (2003).** Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Current microbiology* **46**, 205.
- Krueger, S. R. & Roberts, D. W. (1997).** Soil treatment with entomopathogenic fungi for corn rootworm (*Diabrotica* spp.) larval control. *Biological Control* **9**, 67-74.
- Kuranda, M. J. & Robbins, P. W. (1991).** Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 19758.
- Latgé, J. P. (2007).** The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular microbiology* **66**, 279-290.

- Leuthner, B., Aichinger, C., Oehmen, E., Koopmann, E., Muller, O., Muller, P., Kahmann, R., Bolker, M. & Schreier, P. (2005).** A H₂O₂-producing glyoxal oxidase is required for filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**, 639-650.
- Li, H. M., Crouch, J. A. & Belanger, F. C. (2005).** Fungal endophyte N-acetylglucosaminidase expression in the infected host grass. *Mycological research* **109**, 363-373.
- Li, Y., Zhang, L., Wang, D., Zhou, H., Ouyang, H., Ming, J. & Jin, C. (2008).** Deletion of the *msdS/AfmsdC* gene induces abnormal polarity and septation in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **154**, 1960.
- Limón, M. C., Lora, J. M., García, I., Cruz, J., Llobell, A., Benítez, T. & Pintor-Toro, J. A. (1995).** Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Current genetics* **28**, 478-483.
- Limón, M. C., Pintor-Toro, J. A. & Benítez, T. (1999).** Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology* **89**, 254-261.
- Limón, M. C., Margolles Clark, E., Ben tez, T. & Penttilä, M. (2001).** Addition of substrate binding domains increases substrate binding capacity and specific activity of a chitinase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS microbiology letters* **198**, 57-63.
- Limón, M., Chacón, M., Mejías, R., Delgado-Jarana, J., Rincón, A., Codón, A. & Benítez, T. (2004).** Increased antifungal and chitinase specific activities of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 by addition of a cellulose binding domain. *Applied microbiology and biotechnology* **64**, 675-685.

- Lomer, C., Bateman, R., Johnson, D., Langewald, J. & Thomas, M. (2001).** Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology* **46**, 667-702.
- Lubeck, I., Arruda, W., Souza, B. K., Stanisçuaski, F., Carlini, C. R., Schrank, A. & Vainstein, M. H. (2008).** Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Ecology* **1**, 78-88.
- López-Mondéjar, R., Catalano, V., Kubicek, C. P. & Seidl, V. (2009).** The N-acetylglucosaminidases NAG1 and NAG2 are essential for growth of *Trichoderma atroviride* on chitin. *FEBS Journal* **276**, 5137-5148.
- Ma, C., Ni, X., Chi, Z., Ma, L. & Gao, L. (2007).** Purification and characterization of an alkaline protease from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* for bioactive peptide production from different sources. *Marine Biotechnology* **9**, 343-351.
- Mach, R. L., Peterbauer, C. K., Payer, K., Jaksits, S., Woo, S. L., Zeilinger, S., Kullnig, C. M., Lorito, M. & Kubicek, C. P. (1999).** Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. *Applied and environmental microbiology* **65**, 1858.
- Manalil, N. S., Junior Téo, V., Braithwaite, K., Brumbley, S., Samson, P. & Helena Nevalainen, K. (2010).** Comparative analysis of the *Metarhizium anisopliae* secretome in response to exposure to the greyback cane grub and grub cuticles. *Fungal Biology* **114**, 637-645.
- Manczinger, L., Molnár, A., Kredics, L. & Antal, Z. (2002).** Production of bacteriolytic enzymes by mycoparasitic *Trichoderma* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **18**, 147-150.
- Mann, M. & Jensen, O. N. (2003).** Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature biotechnology* **21**, 255-261.

- Markovich, N. & Kononova, G. (2003).** Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* **39**, 341-351.
- Merzendorfer, H. & Zimoch, L. (2003).** Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of experimental biology* **206**, 4393.
- Milner, R. (2000).** Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. *Biocontrol News and Information* **21**, 47N-50N.
- Mo, W. & Karger, B. L. (2002).** Analytical aspects of mass spectrometry and proteomics. *Current opinion in chemical biology* **6**, 666-675.
- Mochi, D. A., Monteiro, A. C., De Bortoli, S. A., Dória, H. O. S. & Barbosa, J. C. (2006).** Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitidis capitata* (Wied.)(Diptera: Tephritidae) in soil with different pesticides. *Neotropical Entomology* **35**, 382-389.
- Murad, A. M., Noronha, E. F., Miller, R. N. G., Costa, F. T., Pereira, C. D., Mehta, A., Caldas, R. A. & Franco, O. L. (2008).** Proteomic analysis of *Metarhizium anisopliae* secretion in the presence of the insect pest *Callosobruchus maculatus*. *Microbiology* **154**, 3766.
- Musrati, R., Kollarova, M., Mernik, N. & Mikulasova, D. (1998).** Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. *General physiology and biophysics* **17**, 193.

- Nowierski, R. M., Zeng, Z., Jaronski, S., Delgado, F. & Swearingen, W. (1996).** Analysis and modeling of time-dose-mortality of *Melanoplus sanguinipes*, *Locusta migratoria migratorioides*, and *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) from *Beauveria*, *Metarhizium*, and *Paecilomyces* isolates from Madagascar. *Journal of invertebrate pathology* **67**, 236-252.
- Osborn, R. W., De Samblanx, G. W., Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S., Van Leuven, F., Attenborough, S., Rees, S. B. & Broekaert, W. F. (1995).** Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS letters* **368**, 257-262.
- Pal, S., St Leger, R. J. & Wu, L. P. (2007).** Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 8969.
- Patil, R. S., Ghormade, V. & Deshpande, M. V. (2000).** Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology* **26**, 473-483.
- Pazzagli, L., Cappugi, G., Manao, G., Camici, G., Santini, A. & Scala, A. (1999).** Purification, characterization, and amino acid sequence of cerato-platanin, a new phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 24959.
- Pedrini, N., Crespo, R. & Juárez, M. P. (2007).** Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **146**, 124-137.
- Peplow, A. W., Tag, A. G., Garifullina, G. F. & Beremand, M. N. (2003).** Identification of new genes positively regulated by Tri10 and a regulatory network for trichothecene mycotoxin production. *Applied and environmental microbiology* **69**, 2731.

- Peterbauer, C., Brunner, K., Mach, R. & Kubicek, C. (2002).** Identification of the N-acetyl-D-glucosamine-inducible element in the promoter of the *Trichoderma atroviride* nag1 gene encoding N-acetyl-glucosaminidase. *Molecular Genetics and Genomics* **267**, 162-170.
- Pinto, A., Barreto, C., Shranck, A., Ulhoa, C. & Vainstein, M. (1997).** Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology* **43**, 276-281.
- Polar, P., de Muro, M. A., Kairo, M. T. K., Moore, D., Pegram, R., John, S. A. & Roach-Benn, C. (2005).** Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. *Veterinary parasitology* **134**, 159-167.
- Quesada-Moraga, E., Navas-Cortés, J. A., Maranhao, E. A. A., Ortiz-Urquiza, A. & Santiago-Álvarez, C. (2007).** Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *mycological research* **111**, 947-966.
- Rep, M., Van Der Does, H. C., Meijer, M., Van Wijk, R., Houterman, P. M., Dekker, H. L., De Koster, C. G. & Cornelissen, B. J. C. (2004).** A small, cysteine rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I 3 mediated resistance in tomato. *Molecular microbiology* **53**, 1373-1383.
- Reyes, F., Calatayud, J., Vazquez, C. & Jesús Martínez, M. (1989).** [beta]-N-Acetylglucosaminidase from *Aspergillus nidulans* which degrades chitin oligomers during autolysis. *FEMS microbiology letters* **65**, 83-87.
- Roberts, D. W. & St Leger, R. J. (2004).** *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in applied microbiology* **54**, 1-70.

- Rodrigues, M. L., Nimrichter, L., Oliveira, D. L. & other authors (2007).** Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryotic Cell* **6**, 48.
- Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Oliveira, D. L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J. D., Almeida, I. C. & Casadevall, A. (2008).** Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell* **7**, 58.
- Rosa e Silva, L. K., Staats, C. C., Goulart, L. S., Morello, L. G., Pelegrinelli Fungaro, M. H., Schrank, A. & Vainstein, M. H. (2008).** Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. *Research in Microbiology* **159**, 221-229.
- Sahai, A. & Manocha, M. (1993).** Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiology Reviews* **11**, 317-338.
- Santi, L., Silva, W. O. B., Pinto, A. F. M., Schrank, A. & Vainstein, M. H. (2009).** Differential immunoproteomics enables identification of *Metarhizium anisopliae* proteins related to *Rhipicephalus microplus* infection. *Research in microbiology* **160**, 824-828.
- Santi, L., Silva, W. O. B., Pinto, A. F. M., Schrank, A. & Vainstein, M. H. (2010).** *Metarhizium anisopliae* host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. *Fungal Biology* **114**, 312-319.
- Scholte, E. J., Njiru, B. N., Smallegange, R. C., Takken, W. & Knols, B. G. J. (2003).** Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s. s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria Journal* **2**, 29.

- Schrank, A., Bassanasi, M. C., Pinto Júnior, H., Costa, S. V., Bogo, M. R. & Silva, M. S. N. (1993). Superoxide dismutases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Ciênc cult(São Paulo)* **45**, 200-205.
- Schrank, A. & Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*.
- Screen, S. E., Hu, G. & St Leger, R. J. (2001). 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* **78**, 260-266.
- Seidl, V., Huemer, B., Seiboth, B. & Kubicek, C. P. (2005). A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS Journal* **272**, 5923-5939.
- Seidl, V., Marchetti, M., Schandl, R., Allmaier, G. & Kubicek, C. P. (2006). Ep11, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *FEBS Journal* **273**, 4346-4359.
- Seidl, V. (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews* **22**, 36-42.
- Selvaggini, S., Munro, C. A., Paschoud, S., Sanglard, D. & Gow, N. A. R. (2004). Independent regulation of chitin synthase and chitinase activity in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **150**, 921.
- Shah, P. & Pell, J. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied microbiology and biotechnology* **61**, 413-423.

- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. (1996).** Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry* **68**, 850-858.
- Silva, A. M. S., Correa, G. C. & Reis, E. M. (2007).** Proteomica - Uma abordagem funcional do estudo do genoma. *Saúde & Ambiente em Revista* **2**, 01-10.
- Silva, W. O. B., Santi, L., Berger, M., Pinto, A. F. M., Guimarães, J. A., Schrank, A. & Vainstein, M. H. (2009).** Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry* **44**, 829-834.
- Slack, F. J. & Ruvkun, G. (1999).** A novel repeat domain that is often associated with RING finger and B-box motifs. *TIBS* **23**, 474-475.
- Smits, G. J., van den Ende, H. & Klis, F. M. (2001).** Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* **147**, 781.
- Sogorb, M. A., Diaz-Alejo, N., Escudero, M. A. & Vilanova, E. (1998).** Phosphotriesterase activity identified in purified serum albumins. *Archives of toxicology* **72**, 219-226.
- Sousa, M. V., Fontes, W. & Ricart, C. A. O. (2007).** Análise de Proteomas. *Biociência & Desenvolvimento*, 12-14.
- St. Leger, R., Charnley, A. & Cooper, R. (1987).** Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Archives of biochemistry and biophysics* **253**, 221-232.
- St. Leger, R., Cooper, R. & Charnley, A. (1991a).** Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **58**, 415-426.

- St. Leger, R., Goettel, M., Roberts, D. & Staples, R. (1991b).** Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **58**, 168-179.
- St. Leger, R. J., Bidochka, M. J. & Roberts, D. W. (1994).** Characterization of a novel carboxypeptidase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Archives of biochemistry and biophysics* **314**, 392-398.
- St. Leger, R., Joshi, L., Bidochka, M. J., Rizzo, N. W. & Roberts, D. W. (1996a).** Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Applied and environmental microbiology* **62**, 1257.
- St. Leger, R., Joshi, L., Bidochka, M. J., Rizzo, N. W. & Roberts, D. W. (1996b).** Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Applied and environmental microbiology* **62**, 907.
- St. Leger, R., Joshi, L., Bidochka, M. J. & Roberts, D. W. (1996c).** Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 6349.
- St. Leger, R., Joshi, L. & LACEY, L. (1997).** The application of molecular techniques to insect pathology with emphasis on entomopathogenic fungi. In: *Manual of Techniques in Insect Pathology*, Lacey, L(Ed) Academic Press, New York.
- Staats, C. C. (2007).** Estudo funcional de genes do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. In: *Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular*: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Stals, I., Samyn, B., Sergeant, K., White, T., Hoorelbeke, K., Coorevits, A., Devreese, B., Claeysens, M. & Piens, K. (2010).** Identification of a gene coding for a deglycosylating enzyme in *Hypocrea jecorina*. *FEMS microbiology letters* **303**, 9-17.
- Stein, H., Honig, A., Miller, G., Erster, O., Eilenberg, H., Csonka, L. N., Szabados, L., Koncz, C. & Zilberstein, A. (2011).** Elevation of free proline and proline-rich protein levels by simultaneous manipulations of proline biosynthesis and degradation in plants. *Plant Science*, **181**, 140-150.
- Suarez, B., Rey, M., Castillo, P., Monte, E. & Llobell, A. (2004).** Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. *Applied microbiology and biotechnology* **65**, 46-55.
- Szabados, L. & Savouré, A. (2010).** Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science* **15**, 89-97.
- Taylor, R. H., Acland, D. P., Attenborough, S., Cammue, B., Evans, I. J., Osborn, R. W., Ray, J. A., Rees, S. B. & Broekaert, W. F. (1997).** A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 24480.
- Tartar, A. & Boucias, D. G. (2004).** A pilot-scale expressed sequence tag analysis of *Beauveria bassiana* gene expression reveals a tripeptidyl peptidase that is differentially expressed in vivo. *Mycopathologia* **158**, 201-209.
- Templeton, M. D., Rikkerink, E. H. A. & Beever, R. E. (1994).** Small, cysteine-rich proteins and recognition in fungal-plant interactions. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions* **7**, 320-325.

- Timson, D. J. & Reece, R. J. (2003).** Identification and characterisation of human aldose 1-epimerase. *FEBS letters* **543**, 21-24.
- Tremacoldi, C., Monti, R., Selistre-De-Araújo, H. & Carmona, E. (2007).** Purification and properties of an alkaline protease of *Aspergillus clavatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**, 295-299.
- Villas-Bôas, S. G. & Gombert, A. K. (2006).** Análise do Metaboloma. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, 58-69.
- Viterbo, A., Haran, S., Friesem, D., Ramot, O. & Chet, I. (2001).** Antifungal activity of a novel endochitinase gene (*chit36*) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM. *FEMS microbiology letters* **200**, 169-174.
- Viterbo, A., Montero, M., Ramot, O., Friesem, D., Monte, E., Llobell, A. & Chet, I. (2002).** Expression regulation of the endochitinase *chit36* from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Current genetics* **42**, 114-122.
- von Heijne, G. (1990).** The signal peptide. *Journal of Membrane Biology* **115**, 195-201.
- Wang, C., Typas, M. A. & Butt, T. M. (2002).** Detection and characterisation of *pr1* virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS microbiology letters* **213**, 251-255.
- Wang, C., Hu, G. & St Leger, R. J. (2005).** 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* **42**, 704-718.
- Wang, C. & St Leger, R. J. (2007).** The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell* **6**, 808.

Wessels, J. (2000). Hydrophobins, unique fungal proteins. *Mycologist* **14**, 153-159.

Zhang, Y., Liu, Z. & Chen, X. (2007). Cloning and expression of a mannanase gene from *Erwinia carotovora* CXJZ95-198. *Annals of Microbiology* **57**, 623-628.

Zhang, S. & Xia, Y. (2008). Identification of genes preferentially expressed during microcycle conidiation of *Metarhizium anisopliae* using suppression subtractive hybridization. *FEMS microbiology letters* **286**, 71-77.

Zheng, S., Wang, H. & Zhang, G. (2011). A novel alkaline protease from wild edible mushroom *Termitomyces albuminosus*. *Acta biochimica Polonica* **58**, 269.

Zhou, A., Martin, S., Lipkind, G., LaMendola, J. & Steiner, D. F. (1998). Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 11107.

ANEXOS

Anexo 1. Proteínas identificadas de *M. anisopliae* que não compreenderam o critério de identificação estabelecido para este trabalho (descritos no item 4.2.0 e no item 5.2). **G1-G9:** *Spots* de proteínas secretadas de cultivos de 96 h de *M. anisopliae* na presença de glicose. **Q1-Q7:** *Spots* de proteínas secretadas de cultivos de 96 h de *M. anisopliae* na presença de quitina. **N1-N17:** Regiões de proteínas secretadas de cultivos de 72 h de *M. anisopliae* na presença de GlcNAc.

| <i>Spot/</i> <i>Regiões</i> | Proteínas Identificadas ^a | Nº acesso ^b | pI/massa (kDa) observada | pI/massa (kDa) teórica | Score MASCOT ^c | Cobertura |
|--------------------------------|--|------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------------------|-----------|
| G1 | Protease tripsina | MA02007 | 4,90/44,00 | 6,59/36,48 | 48 | 7% |
| G2 | Proteína relacionada com precursor Glioxal oxidase | MA00808 | 4,90/40,00 | 5,47/39,83 | 35 | 1% |
| | Homóloga à N,O-diacetilmuramidase | MA09595 | 4,90/40,00 | 6,94/24,23 | 31 | 14% |
| | Proteína contendo o domínio "Zinc-finger" | MA05926 | 4,90/40,00 | 9,05/88,79 | 28 | 1% |
| G3 | Hipotética | MA07725 | 4,90/34,00 | 6,79/63,25 | 25 | 1% |
| G5 | 4MeS | MA09142 | 4,50/20,00 | 4,76/18,24 | 123 | 28% |
| | Protease semelhante a tripsina (<i>try1</i>) | MA09286 | 4,50/20,00 | 4,93/26,70 | 49 | 8% |
| G6 | Hipotética conservada | MA09646 | 4,90/18,00 | 5,13/14,21 | 36 | 7% |
| G7 | Hipotética conservada | MA09646 | 5,10/17,00 | 5,13/14,21 | 43 | 7% |
| G8 | Hipotética conservada | MA09646 | 5,50/18,00 | 5,13/14,21 | 39 | 7% |
| G9 | Hipotética conservada | MA05177 | 5,70/18,00 | 5,35/25,82 | 71 | 40% |
| | Hipotética conservada | MA09646 | 5,70/18,00 | 5,13/14,21 | 27 | 7% |
| Q1 | Homóloga à Tripeptidil-peptidase 1 | MA01092 | 4,90/42,50 | 4,70/57,86 | 219 | 7% |
| | Quitinase CHIT42 (<i>chit1</i>) [chiMaA1] | MA03131 | 4,90/42,50 | 5,38/46,15 | 62 | 2% |
| | Possível 1-fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato fosfodiesterase 1 | MA06042 | 4,90/42,50 | 5,79/71,56 | 27 | 1% |
| | Proteína do componente do <i>corpo</i> polar do fuso mitótico (SPB) alp4 | MA08883 | 4,90/42,50 | 6,65/107,41 | 21 | 1% |

Anexo 1. (continuação)

| Spot/ Regiões | Proteínas Identificadas ^a | Nº acesso ^b | pI/massa (kDa) observada | pI/massa (kDa) teórica | Score MASCOT ^c | Cobertura |
|------------------|---|------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------------------|-----------|
| Q3 | Quitinase CHIT30 (<i>chi3</i>) [chiMaB2] | MA02097 | 5,50/28,00 | 5,24/34,14 | 271 | 30% |
| | Hipotética conservada | MA05177 | 5,50/28,00 | 5,35/25,82 | 70 | 50% |
| Q4 | Oxidoreductase não caracterizada | MA04347 | 5,70/28,00 | 6,46/38,12 | 146 | 25% |
| | Hipotética conservada | MA05177 | 5,70/28,00 | 5,35/25,82 | 30 | 15% |
| Q5 | Oxidoreductase não caracterizada | MA04347 | 5,80/28,00 | 6,46/38,12 | 79 | 7% |
| Q6 | Hipotética conservada | MA05177 | 5,80/26,50 | 5,35/25,82 | 43 | 10% |
| Q7 | Hipotética conservada | MA05109 | 5,90/26,50 | 5,34/50,16 | 61 | 21% |
| | Quimotripsina | MA02792 | 5,90/26,50 | 5,16/38,25 | 24 | 8% |
| N1 | Glicana 1,3-β-glicosidase [truncada] | MA07448 | 50,00 | 5,70/44,95 | 58 | 10% |
| | Quitinase [chiMaB4] | MA01953 | 50,00 | 4,93/44,20 | 47 | 4% |
| | ATPase não caracterizada | MA04088 | 50,00 | 5,70/54,81 | 28 | 4% |
| N2 | Hipotética conservada | MA05109 | 48,00 | 5,34/50,16 | 47 | 3% |
| | Homóloga à N,O- diacetilmuramidase | MA09595 | 48,00 | 6,94/24,23 | 33 | 11% |
| | Protease do tipo subtilisina Pr1A | MA10086 | 48,00 | 6,59/45,42 | 31 | 5% |
| | Proteína quinase não caracterizada | MA10777 | 48,00 | 5,79/56,25 | 20 | 2% |
| N3 | Quitinase CHIT42 (<i>chit1</i>) [chiMaA1] | MA03131 | 45,00 | 5,38/46,15 | 194 | 20% |
| | Possível agmatine deiminase | MA04505 | 45,00 | 4,71/40,14 | 167 | 39% |
| | Glicana 1,3-β-glicosidase [truncada] | MA07448 | 45,00 | 5,70/44,95 | 97 | 17% |
| | Homóloga à tripeptidil- peptidase 1 | MA01092 | 45,00 | 4,70/57,86 | 49 | 2% |
| | Homóloga à Manosil- oligossacarídeo α-1,2- manosidase | MA03305 | 45,00 | 5,17/56,02 | 35 | 14% |

Anexo 1. (continuação)

| Spot/ Regiões | Proteínas Identificadas^a | Nº acesso^b | pI/massa (kDa) observada | pI/massa (kDa) teórica | Score MASCOT^c | Cobertura |
|--------------------------|---|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------|
| N3 | Hipotética conservada | MA08606 | 45,00 | 5,47/39,83 | 32 | 9% |
| | Hipotética conservada | MA09715 | 45,00 | 8,70/25,05 | 22 | 4% |
| | Possível fator 1 de montagem da cromatina | MA06233 | 45,00 | 5,79/69,85 | 17 | 2% |
| N4 | Hipotética conservada | MA06224 | 38,50 | 4,78/25,22 | 117 | 24% |
| | Homóloga à proteína regulatória de resposta ao pH - palC | MA02611 | 38,50 | 8,08/52,14 | 36 | 1% |
| | Hipotética conservada | MA05177 | 38,50 | 5,35/25,82 | 31 | 24% |
| | Quitinase [chiMaD1] | MA08132 | 38,50 | 5,55/36,59 | 31 | 11% |
| | Proteína relacionada com precursor Glioxal oxidase | MA00808 | 38,50 | 5,47/39,83 | 31 | 1% |
| | Hipotética conservada | MA00379 | 38,50 | 7,02/36,14 | 23 | 10% |
| | Tripeptidil-peptidase | MA07941 | 38,50 | 6,27/76,67 | 23 | 2% |
| | Hipotética conservada | MA04655 | 38,50 | 5,70/44,95 | 18 | 2% |
| N5 | Quitinase CHIT42 (<i>chit1</i>) [chiMaA1] | MA03131 | 37,50 | 5,38/46,15 | 145 | 16% |
| | Hipotética conservada | MA04545 | 37,50 | 5,61/40,23 | 90 | 19% |
| | Hipotética conservada | MA04555 | 37,50 | 5,70/44,95 | 57 | 2% |
| | Hipotética conservada | MA09715 | 37,50 | 8,70/25,05 | 38 | 4% |
| | Homóloga à Manosil-oligossacarídeo α -1,2-manosidase | MA03305 | 37,50 | 5,17/56,02 | 25 | 2% |
| | Quitinase [chiMaA9] | MA03036 | 37,50 | 5,78/75,77 | 24 | 3% |
| N6 | Hipotética conservada | MA08669 | 36,56 | 4,82/37,16 | 61 | 4% |
| | Proteína rica em cisteína | MA07422 | 36,56 | 5,73/36,66 | 53 | 16% |

Anexo 1. (continuação)

| Spot/ Regiões | Proteínas Identificadas^a | Nº acesso^b | pI/massa (kDa) observada | pI/massa (kDa) teórica | Score MASCOT^c | Cobertura |
|--------------------------|---|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------|
| N6 | Hipotética conservada | MA04545 | 36,56 | 5,61/40,23 | 49 | 17% |
| | Hipotética conservada | MA09715 | 36,56 | 8,70/25,05 | 28 | 4% |
| | Hipotética conservada | MA00726 | 36,56 | 8,78/25,68 | 23 | 9% |
| | Hipotética conservada | MA04673 | 36,56 | 6,65/31,65 | 17 | 9% |
| | Hipotética conservada | MA01263 | 36,56 | 4,90/37,69 | 17 | 2% |
| N7 | Quitinase [chiMaB4] | MA01953 | 34,68 | 4,93/44,20 | 69 | 4% |
| | Hipotética conservada | MA08669 | 34,68 | 4,82/37,16 | 69 | 4% |
| | Hipotética conservada | MA08606 | 34,68 | 5,47/39,83 | 47 | 4% |
| | Hipotética conservada | MA09715 | 34,68 | 8,70/25,05 | 25 | 4% |
| | Homóloga à proteína associada a membrana vacuolar iml-1 | MA06859 | 34,68 | 8,88/213,78 | 15 | 1% |
| N8 | Proteína rica em cisteína | MA07422 | 33,75 | 5,73/36,66 | 54 | 16% |
| | Proteína relacionada com precursor Glioxal oxidase | MA00808 | 33,75 | 4,91/118,25 | 50 | 1% |
| | Hipotética conservada | MA09715 | 33,75 | 8,70/25,05 | 29 | 9% |
| | Hipotética conservada | MA05109 | 33,75 | 5,34/50,16 | 17 | 2% |

^aNúmero de acesso do banco de dados SABIA (Almeida *et al.*, 2004).^bProteína identificada de acordo com o banco de dados SABIA (Almeida *et al.*, 2004).

Anexo 2. Proteínas identificadas de *M. anisopliae* neste trabalho e seus números de EC (*Enzyme Commission number*) correspondentes. Para identificar o número de EC das proteínas foram utilizados duas plataformas: Enzyme EC numbers (http://www.genome.jp/htbin/get_htext?ECtable) e BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.info/>).

| Nº acesso ^b | Proteínas Identificadas ^a | Nº EC ^c |
|------------------------|--|--------------------|
| (MA07448) | Glicana 1,3-β-glicosidase [truncada] | EC 3.2.1.58 |
| (MA02097) | Quitinase CHIT30 | EC 3.2.1.14 |
| (MA02097) | Quitinase CHIT42 | EC 3.2.1.14 |
| (MA01953) | Quitinase chiMaB4 | EC 3.2.1.14 |
| (MA08132) | Quitinase chiMaD1 | EC 3.2.1.14 |
| (MA04771) | N-acetil-beta-glicosaminidase | EC 3.2.1.- |
| (MA09595) | Homóloga à N,O-diacetilmuramidase | EC 3.2.1.17 |
| (MA00937) | N,O-diacetilmuramidase não caracterizada | EC 3.2.1.17 |
| (MA03305) | Manosil-oligossacarídeo α-1,2-manosidase | EC 3.2.1.113 |
| (MA06844) | Glicosil hidrolase | EC 3.2.1.101 |
| (MA09695) | Protease do tipo subtilisina Pr1B | EC 3.4.21.62 |
| (MA09188) | Protease do tipo subtilisina Pr1D | EC 3.4.21.62 |
| (MA02966) | Homóloga à aorsina | EC 3.4.21.- |
| (MA01092) | Homóloga à tripeptidil-pepditase 1 | EC 3.4.14.- |
| (MA02991) | Carboxipeptidase | EC 3.4.17.- |
| (MA02007) | Protease tripsina | EC 3.4.21.- |
| (MA09286) | Protease semelhante à tripsina | EC 3.4.21.- |
| (MA04344) | Proteína rica em prolina 5MeD | EC 3.1.8.- |
| (MA03561) | Provável aldose 1-epimerase | EC 5.1.3.3 |

^aNúmero de acesso do banco de dados SABIA (Almeida *et al.*, 2004).

^bProteína identificada de acordo com o banco de dados SABIA (Almeida *et al.*, 2004).

^c*Enzyme Commission number*

MINI-CURRICULUM

BERINGER, J. S.

1. DADOS PESSOAIS

Nome Juliana da Silva Beringer
Nascimento 12/05/1985 – São Leopoldo/RS

Endereço profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Av. Bento Gonçalves, 9500 Campus Vale
Agronomia - Porto Alegre
91501-970, RS – Brasil

Telefone profissional 51 33086079
Endereço eletrônico jusberinger@gmail.com

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2009-2011 Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Identificação de proteínas secretadas e quitinases do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*
Orientador: Augusto Schrank
Bolsista do: CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Apoio Técnico a Pesquisa - NM

2003-2009 Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura e Bacharel)
Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, São Leopoldo, Brasil
Título: Análise e identificação de proteínas secretadas pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*
Orientadora: Raquel de Castilhos-Fortes
Co-orientador: Augusto Schrank
Bolsista da: FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - Iniciação científica – BIC

2.1 FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Mini - Curso: Biotecnologia: estratégias promissoras para a conservação da diversidade vegetal

Instituição: Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS
IX Reunião Acadêmica da Biologia na Unisinos - RABU

Período: 14 a 16/10/03

Mini - Curso: Genética e Conservação

Instituição: Universidade Luterana do Brasil – ULBRA
XVI Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul

Período: 12/07/04

Curso: Biologia e Conservação de Baleias, Botos e Golfinhos

Instituição: Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul – GEMARS

Período: 9 a 13/05/05

Mini - Curso: Observação da Biologia de Planárias

Instituição: Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS
X Reunião Acadêmica da Biologia na Unisinos - RABU

Período: 3 a 7/10/05

Oficina: Microbiologia Aplicada

Instituição: Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS
X Reunião Acadêmica da Biologia na Unisinos - RABU

Período: 3 a 7/10/05

Curso: Ecologia de Microrganismos em alimentos: Leite, Carne e Vegetais

Instituição: Sociedade Brasileira de Microbiologia – SBM
XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia - CBM

Período: 23 a 25/11/05

Curso: Macroinvertebrados bioindicadores de qualidade d'água e do ambiente

Instituição: Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS
Mostra Unisinos de Iniciação Científica

Período: 05 a 08/06/06

Curso: Manejo Integrado de Agrossistemas

Instituição: Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS

Período: 16 a 01/09/06

Curso: Biodiversidade do Pantanal

Instituição: Instituto de Pesquisa Acqua Azuli
Base de Estudos e Pesquisas do Pantanal - Corumbá/MS

Período: 24 a 28/01/07

Curso: Controle Microbiano de Vetores e Pragas: Bactérias Entomopatogênicas
Instituição: Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS
Período: 14 a 19/05/07

Curso: Ecologia reprodutiva de anfíbios
Instituição: Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS
 Mostra Unisinos de Iniciação Científica
Período: 28/05/07

Curso: Introdução a Biologia molecular computacional
Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
 Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia
Período: De 6/07 a 10/08/07

Curso: Curso de criação e manejo de galinhas caipiras
Instituição: Prefeitura Municipal de Novo Hamburgo – Secretaria municipal de agricultura
Período: 09/10/08

3. ESTÁGIOS

Instituição: Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS
Local: Laboratório de Microbiologia
Orientadora: Raquel Castilhos-Fortes
 Estágio Curricular
Período: Março de 2005 à agosto de 2007
Atividades desenvolvidas: Preparo e esterilização de material (meios de cultura, soluções, reagentes), isolamento de fungos a partir de insetos (*Tibraca limbativentris*, *Oeobalus poecilus*), microscopia e identificação de fungos filamentosos, realização de uma micoteca (glicerol e tubo de ensaio), análise de água, bioensaios com fungos entomopatogênicos (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Aspergillus ochraceus*, *Paecilomyces fumosoroseus*), extratos vegetais de plantas medicinais.

Instituição: Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS
Local: Laboratório de Microbiologia
Orientadora: Lidia Mariana Fiuza
Bolsista da: FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - Iniciação científica – BIC
Período: Agosto de 2006 à julho de 2007
Atividades desenvolvidas: Manutenção de insetos, na sala de criação de insetos da Unisinos; realização de bioensaios com bactéria (*Bacillus thuringiensis*) com larvas e adultos de Lepidópteros e Hemípteros (*Spodoptera frugiperda*, *Oeobalus poecilus*).

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Local: Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos

Orientador: Augusto Schrank

Bolsista da: FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - Iniciação científica – BIC

Período: Julho de 2007 à março de 2009

Atividades desenvolvidas: Preparação de meios de cultura, extração e quantificação de proteínas, eletroforese uni e bidimensionais (SDS-PAGE), tripsinização e análise de proteínas por espectrometria de massas (MS/MS), utilização do *software* MASCOT.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

Menção Honrosa

Evento: Mostra Unisinos de Iniciação Científica 2007

Instituição: Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS

Título: Efeito de *Aspergillus ochraceus* e *Beauveria bassiana* sobre *Cornitermes cumulans* (Isoptera:Termitidae)

Orientadora: Raquel Castilhos-Fortes

5. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA (Trabalhos publicados em Anais de eventos)

1. BERINGER, J.S.; SCHULTZ, F.M.; CASTILHOS-FORTES, R. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre o crescimento do fitopatógeno *Fusarium solani*. In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos-SP. **CD do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005.**
2. SCHULTZ, F.M.; BERINGER, J.S.; CASTILHOS-FORTES, R. Avaliação do efeito inibitório de extratos de plantas medicinais sobre o crescimento de *Fusarium oxysporum*. In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos-SP. **CD do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005.**
3. BERINGER, J.S.; ZIMMER, S.; SOUZA, C.C.T.; CASTILHOS-FORTES, R.; FIUZA, L.M. Efeito de *Aspergillus ochraceus* e *Beauveria bassiana* sobre *Cornitermes cumulans* (Isoptera:Termitidae). In: Mostra Unisinos de Iniciação Científica, UNISINOS, 2007, São Leopoldo. **CD da Mostra Unisinos de Iniciação Científica 2007-UNISINOS.**
4. BERINGER, J.S.; BROETTO, L.; SCHRANK, A. Análise e identificação de proteínas secretadas pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. In: XX Salão de Iniciação Científica – UFRGS, 2007, Porto Alegre. **CD do XX Salão de Iniciação Científica – UFRGS, 2007.**
5. BERINGER, J.S.; ZIMMER, S.; OLIVEIRA, J.V.; CASTILHOS-FORTES, R. Efeito de *Aspergillus flavus* sobre *Oebalus poecilus*

- (Hemiptera:Pentatomidae). In: V Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 2007, Pelotas. **Anais do V Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado**, 2007, v.1, p.73 -74.
6. BERINGER, J.S.; ZIMMER, S.; SOUZA, C.C.T.; OLIVEIRA, J.V.; CASTILHOS-FORTES, R. Isolamento e identificação de fungos a partir de *Tibraca limbativentris* (Hemiptera:Pentatomidae). In: V Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 2007, Pelotas. **Anais do V Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado**, 2007, v.1, p.75 -76.
 7. BERINGER, J.S.; BROETTO, L.; BOLDO, J.T.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Identificação das quitinasas do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. In: XI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009, Porto Alegre. **Livro de Resumos da XI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS**, 2009, v.1, p.56.
 8. JUNGES, A.; BOLDO, J.T.; LEAL, A.L.; SOUZA, B.K.; SILVEIRA, C.P.; STAATS, C.C.; OLIVEIRA, E.; BERINGER, J.S.; BROETTO, L.; SANTI, L.; SILVA, L.K.R.; AZEVEDO, L.G.; ALMEIDA, L.G.P.; LANDELL, M.; FALCÃO, V.C.A.; SILVA, W.O.B.; VASCONCELOS, A.T.R.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Biomineração de quitinasas da família 18 das Glicosil-hidrolases no genoma de *Metarhizium anisopliae*. In: XII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2010, Porto Alegre. **Livro de Resumos da XII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS**, 2010, v.1, p.07.
 9. BERINGER, J.S.; BROETTO, L.; SANTI, L.; STAATS, C.C.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Identificação das quitinasas do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. In: XII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2010, Porto Alegre. **Livro de Resumos da XII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS**, 2010, v.1, p.51.