

# ESTUDO FUNCIONAL DAS QUITINASES DO SUBGRUPO D DE *Metarhizium anisopliae*

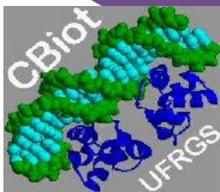
Nicolau Sbaraini Oliveira, Ângela Junges, Rana Louise Andrade da Paixão, Eder Silva de Oliveira, Thaiane Rispoli, e Augusto Schrank



UFRGS  
PROPEQ

XXV SIC  
Salão Iniciação Científica

CB - Ciências Biológicas



LBCMFE  
Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos



## Introdução

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é considerado modelo para estudos das interações entre patógenos e seus hospedeiros devido a sua alta capacidade de infectar diferentes artrópodes [3]. Para infectar seus hospedeiros *M. anisopliae* deve primeiramente romper a cutícula do inseto, composta majoritariamente por quitina, um componente comum a insetos e fungos. Para romper a cutícula, o fungo produz diversas enzimas hidrolíticas, dentre as quais estão as quitinases [3]. As quitinases não atuam somente em processos nutricionais, mas também apresentam funções morfogênicas e autolíticas, atuando em diferentes etapas do desenvolvimento do fungo e na manutenção do seu ciclo de vida [4][7]. Estas enzimas são caracterizadas pela presença do domínio de glicosil hidrolase 18 (GH18) [4]. Atribuir a função dessas quitinases em cada um desses processos é um dos objetivos de estudo em fungos entomopatogênicos [3]. Uma análise genômica realizada em nosso laboratório, na linhagem E6 de *M. anisopliae*, identificou vinte e quatro quitinases que foram categorizadas em quatro subgrupos, sendo nove pertencentes ao subgrupo A, sete ao B, quatro ao C e quatro a um novo subgrupo D [2]. As quitinases do subgrupo D (*chimaD1*, *chimaD2*, *chimaD3* e *chimaD4*) são as que mais diferem em relação as vinte e quatro. Estudos de genes ortólogos a esses em outros fungos mostraram que, mesmo possuindo o domínio GH18 que caracteriza as quitinases, sua função é diferente das outras, não atuando diretamente na hidrólise de quitina, tendo sua função ligada a modificações e degradação de glicoproteínas [1][5][6]. Considerando que a função dos genes do subgrupo D em *M. anisopliae* ainda é desconhecida, o presente estudo visa avaliar, através da construção de mutantes funcionais, a função das quitinases do subgrupo D. Outro objetivo é avaliar a conservação destes genes em outros 23 isolados do fungo.

## Resultados e Conclusão

Para a construção dos *cassettes* de deleção dos genes do subgrupo D foram amplificadas regiões de 1.000 pb que flanqueiam os respectivos genes. Utilizado a metodologia de PCR de sobreposição foram fusionadas as regiões flanqueadoras 5' e 3' com o *cassette* de resistência a Glifosinato de amônio, o gene *bar*. Estas construções foram posteriormente clonadas no vetor pCR2.1-TOPO e subsequentemente clonadas no vetor pPZP201BK. Por essa metodologia os *cassettes* para os 4 genes foram corretamente clonados no vetor pCR2.1-TOPO e os *cassettes* para os genes *chimaD1* e *chimaD3* foram clonados no vetor pPZP201BK. O vetor pPZP201BK $\Delta$ *chimaD1* foi usado para a obtenção de mutantes funcionais  $\Delta$ *chimaD1* através da transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, sendo selecionados 148 colônias resistentes a Glifosinato de amônio. A análise dos mutantes está em andamento, sendo identificados a partir de uma primeira análise 8 mutantes funcionais com correta recombinação homóloga, porém esses resultados devem ser confirmados.

A análise da presença dos genes em outras linhagens mostrou que os genes *chimaD1* e *chimaD2* estão presentes em todas os isolados analisados, existindo uma provável pressão seletiva para sua manutenção. O gene *chimaD3* está ausente em alguns isolados, o que nos leva a questionar quais vantagens e desvantagens a presença ou ausência desse gene teria no ciclo de vida do fungo. Os experimentos para verificação da presença do gene *chimaD4* ainda estão em andamento. Quando comparado estes dados com estudos semelhantes realizados para as outras quitinases de *M. anisopliae*, o subgrupo D apresenta a maior conservação. Embora não seja possível afirmar que a ausência do gene nesse experimento implique na ausência do ortólogo, visto que os *primers* utilizados no trabalho foram embasados em uma linhagem específica, o trabalho identificou linhagens com um caminho evolutivo diferente do modelo E6, demonstrando assim a diversidade dessa família gênica no fungo. Tais resultados, quando confirmados, serão de grande utilidade na caracterização desses genes.

## Perspectivas

- Identificação dos mutantes funcionais com correta recombinação homóloga oriundos da transformação do vetor pPZP201BK*chimaD1*.
- Terminar a construção e transformar os vetores portando os *cassettes*  $\Delta$ *chimaD2*,  $\Delta$ *chimaD3* e  $\Delta$ *chimaD1*.
- Análise dos mutantes e caracterização dos genes *chimaD1*, *chimaD2*, *chimaD3* e *chimaD4*.

## Metodologia

Construção de mutantes funcionais

Construção dos *cassettes* de deleção

Clonagem no vetor pCR2.1-TOPO (TOPO® TA Cloning® Kit, Invitrogen)

Clonagem no vetor pPZP201BK (Vetor para transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*)

Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT)

Seleção dos mutantes

Conservação dos genes em outras linhagens de *M. anisopliae*

Cultivo em placa das linhagens

Suspensão de esporos e cultivo em meio líquido

Extração de DNA com solução de lise, fenol e clorofórmio

PCR para os 4 genes utilizando *primers* desenhados para a linhagem E6

Análise em gel de agarose

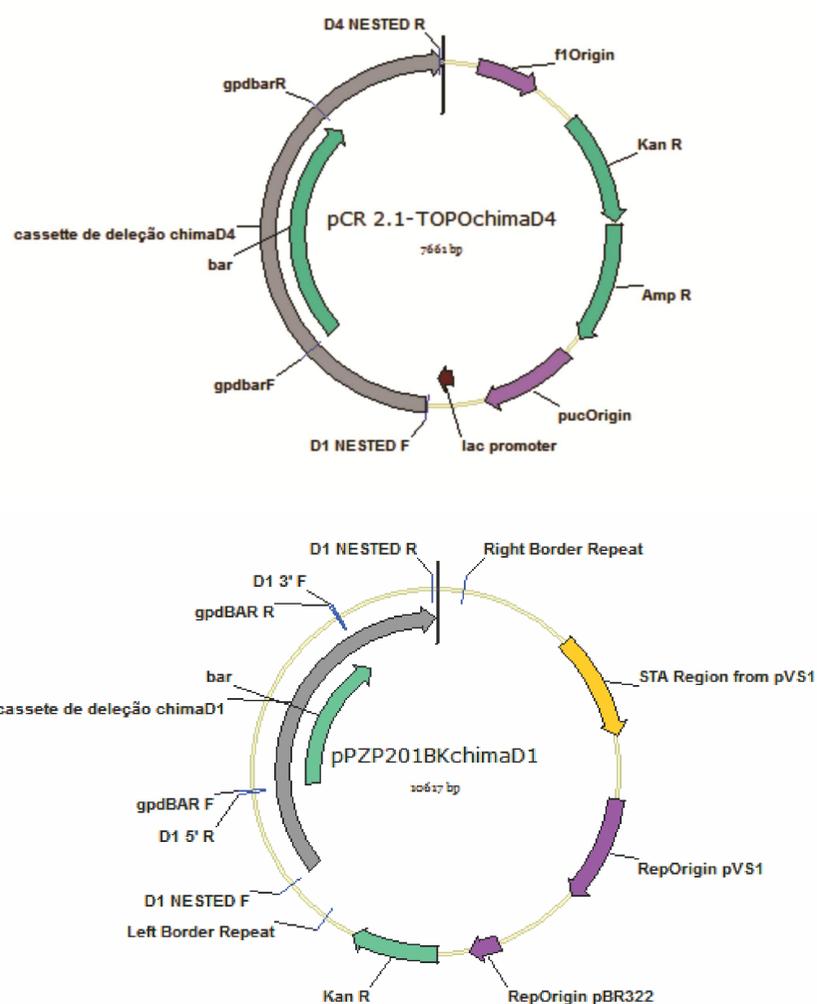


Fig.1. pCR2.1-TOPO $\Delta$ *chimaD4* e pPZP201BK*chimaD1* dois dos vetores construídos neste trabalho.

## Referências

1. Gerlach, J. Q.; Kilcoyne, M.; Farrell, M. P.; Kane, M.; Joshi, L., Differential release of high mannose structural isoforms by fungal and bacterial endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidases. Mol Biosyst 2012, 8 (5), 1472-81.
2. Junges, A., *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: 2010.
3. Schrank, A.; Vainstein, M. H., *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. Toxicon 2010, 56 (7), 1267-74.
4. Seidl, V.; Huemer, B.; Seiboth, B.; Kubicek, C. P., A complete survey of Trichoderma chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. FEBS J 2005, 272 (22), 5923-39.
5. Stals, I.; Karkehabadi, S.; Kim, S.; Ward, M.; Van Landschoot, A.; Devreese, B.; Sandgren, M., High resolution crystal structure of the endo-N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase responsible for the deglycosylation of Hypocrea jecorina cellulases. PLoS One 2012, 7 (7), e40854.
6. Tzelepis, G. D.; Melin, P.; Jensen, D. F.; Stenlid, J.; Karlsson, M., Functional analysis of glycoside hydrolase family 18 and 20 genes in Neurospora crassa. Fungal Genet Biol 2012, 49 (9), 717-30.
7. Zimmermann, G., Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Science and Technology 2007, 17 (9), 879-920.

## Apoio

LNCC, Cbiot, Capes, Fapergs

## Bolsa

PIBIC-CNPQ