

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA – UNIPAMPA

CAMPUS SÃO GABRIEL

BACHAREL EM BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE VETORES DE EXPRESSÃO REGULÁVEIS
UTILIZANDO O PROMOTOR DO GENE DA TREALASE ÁCIDA DE
*METARHIZIUM ANISOPLIAE***

Trabalho de Conclusão de Curso

ALINE WEYH

SÃO GABRIEL, 22 DE JANEIRO DE 2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

W547i Weyh, Aline

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA
TREALASE ÁCIDA DE METARHIZIUM ANISOPLIAE PARA O
DESENVOLVIMENTO DE VETORES REGULÁVEIS / Aline Weyh.

42 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade
Federal do Pampa, BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA, 2015.

"Orientação: Juliano Tomazzoni Boldo".

1. Promotor. 2. Trealase. 3. Indução. 4. Repressão. 5.
Metarhizium anisopliae. I. Título.

ALINE WEYH

**DESENVOLVIMENTO DE VETORES DE EXPRESSÃO REGULÁVEIS
UTILIZANDO O PROMOTOR DO GENE DA TREALASE ÁCIDA DE
*METARHIZIUM ANISOPLIAE***

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Biotecnologista no curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, *campus* São Gabriel.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

Coorientador: Prof. Dr. Augusto Schrank

São Gabriel, 22 de Janeiro de 2015

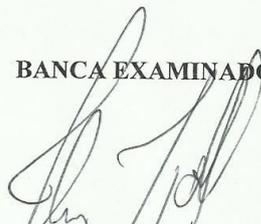
ALINE WEYH

**DESENVOLVIMENTO DE VETORES DE EXPRESSÃO REGULÁVEIS
UTILIZANDO O PROMOTOR DO GENE DA TREALASE ÁCIDA DE
*METARHIZIUM ANISOPLIAE***

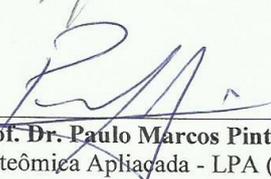
Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora para obtenção do grau de Biotecnologista, no curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, *campus* São Gabriel, com linha de pesquisa em Biologia Molecular e de Microrganismos.

São Gabriel, 22 de Janeiro de 2015

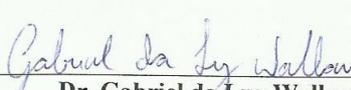
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo (Orientador)
Laboratório Interdisciplinar – APIPAMPA (Unipampa - SG)



Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto
Laboratório de Proteômica Aplicada - LPA (Unipampa - SG)



Dr. Gabriel da Luz Wallau
Pós-doutorando PPGCB – (Unipampa SG)

À minha família, fonte de toda minha força, em especial à minha mãe, meu verdadeiro exemplo de coragem e persistência, e à todos que acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha fonte de vida e apoio, força e coragem, exemplo de vida, que me ensinou a maior de todas as lições: lutar independente da dificuldade, jamais desistir mesmo que todos o tenham feito e seguir sempre com dignidade e bondade até tornar os mais impossíveis sonhos em realidade. Agradeço por ser meu alicerce, por sempre acreditar em mim mesmo quando nem eu mesma acreditava, pelo colo, pelo mate, pelas noites mal dormidas, por “fazer das tripas coração” mas nunca deixar de me auxiliar, por ser Mãe e ser Pai ao mesmo tempo. Obrigada Terezinha Agnes Bremm, obrigada mãe!

Agradeço aos “homens da casa”: o melhor “hacker” de computadores que conheço, pelas incontáveis vezes que teve de consertar tudo que eu estrago no quesito de T.I., por me ouvir de mal humor sempre que algo deu errado, pelas várias sugestões de games cuja falta de tempo não me permitiu jogar e acima de tudo ser um grande amigo e fonte de apoio. Obrigada Osmar Weyh, obrigada irmão. E ao Valmir C. Machado pelos vários socorros imediatos, viagens sem programação, risos, conselhos, pescarias para relaxar a “loucura dos pirata”, por me mostrar o que é ser um pai de verdade. Obrigada!

Agradeço ao Prof. Dr. Augusto Schrank por acreditar em mim quando mais precisei, e me ensinar a real ciência e como exercê-la. Agradeço por todo apoio e carinho ofertado, pela confiança, pela paciência e por ter acolhido uma estranha na família do laboratório 217. Jamais irei esquecer-lo!

Agradeço ao Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo meu querido orientador e, mais que isso, um grande amigo. Obrigada pela oportunidade que me oferecete quando todos me fechavam as portas, pela confiança, pela enorme paciência em me escutar, ensinar, auxiliar sempre que necessário. Obrigada pelos sábios conselhos, pelas várias risadas, pelas dúvidas que me faziam buscar respostas, pelo carinho, pela grande convivência.

Agradeço a banca avaliadora: ao Dr. Gabriel da Luz Wallau pela disposição diária em dividir conhecimentos, por finalmente me fazer entender bioinformática, pelas sextas do inglês no laboratório e pela convivência. Agradeço ao “melhor professor do MUNDO”, o Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto, pelos sábios ensinamentos acadêmicos e pessoais sempre de forma descontraída, pelas várias discussões, pela enorme paciência com minhas atitudes “lamentáveis”, por mostrar-me que sempre posso melhorar e acreditar no meu potencial incentivando da melhor forma possível, não economizo palavras em agradecê-lo pela enorme sinceridade e carinho. É uma honra tê-los por banca examinadora.

Agradeço a Dra. Ângela Junges, nossa querida “Angelita” por todas os “nortes” que passava quando estava “travada”, pelo enorme carinho, ensinamentos, discussões e revisões. Obrigada por me acompanhar nesta caminhada.

Agradeço ao Dr. Éder de Oliveira, por todos os feriados, sábados, domingos e noites no laboratório ao som de Los Hermanos e Pouca Vogal, pelos vários sorrisos, debates, conselhos e ensinamentos, foi um grande mestre, um grande exemplo para mim. Obrigada!

Agradeço à Prof. Dr^a. Marilene Vainstein pelos sábios ensinamentos e trocas de ideias; e aos colegas dos laboratórios do CBIot/UFRGS em especial à Rana por me mostrar persistência, à Letícia, Patrícia, Natália, Rafa, Vanessa e demais colegas mestrandos e doutorandos pelas risadas e conselhos e aos I.C.s Thay, Nico, Bruna, as meninas do 220 e 222. Obrigada!

Agradeço a todos os funcionários da Unipampa, em especial à Adriana Sassi e Adriano pelos auxílios imediatos e à Aline pelos vários incômodos no Lab. de Práticas da Microbiologia. Também agradeço aos funcionários do CBIot, em especial às queridíssimas Terezinha e Rô que sempre me acolhiam com tanto carinho e me lembravam que para ensinar, ter educação e bondade não são necessárias faculdades, que sorrisos são ofertados de graça e humildade é um dom raro mas que ainda existe. Agradeço também à Silvinha poço de generosidade e gentileza. Muito obrigada a todos.

Agradeço a todas as equipes de segurança das duas instituições que diversas vezes me faziam companhia durante madrugadas e noites trabalhando, traziam frutas e lições de vida e histórias para descontrair o estresse sempre me “arrancando” sorrisos e gargalhadas, acobertavam minhas peripécias (escalar árvores, levar mudas de flores, “roubar” abacates, romãs, bananas...), dar bronca quando necessário. Muito obrigada!

Agradeço a todos os demais professores da minha vida acadêmica e pessoal que tornaram possível estar aqui hoje redigindo este trabalho. Agradeço aos professores da E.M.E.F. Gov. Ildo Meneghetti. Agradeço aos professores da C.E. Cândido José de Godoi. Agradeço aos professores da UFRGS, em especial carinho à Prof. Dra. Vera Gayeski e às Profs. Anas. Agradeço a todos os professores da Unipampa, em especial aos Profs. Drs. Andrés e Luís Fabiano a quem recorri em diversas situações complicadas e estavam sempre a postos para me ajudar. Obrigada!

Agradeço a todos os colegas e amigos que me acompanharam durante esta caminhada, em especial aos colegas do laboratório da Unipampa e ao Sóstenes (Baiano) que foi meu apoio tantas vezes que precisei, me forneceu companhia, amizade, carinho. Sou-lhes muito grata.

Agradeço ao Marco Aurélio Martins, companheiro de muitos debates, vivências, ensinamentos, aventuras, agradeço-lhe por tudo mesmo.

Agradeço a Tia Paula, Prof. Ione, Dona Orildes por me acolherem em suas casas de tão bom coração.

Agradeço ao Maicon por fazer parte da minha vida e me mostrar o lado doce dela. Arigatou Kokoro!

Agradeço a Lisiane Molina por sua amizade sincera de anos! Carrego-te em meu coração, és para mim mais que amiga, és uma grande irmã! Obrigada!

E agradeço a todos que a sua maneira auxiliaram na execução deste trabalho de alguma forma, embora não tenha citado nomes, jamais os esquecerei. Meu mais sincero obrigada!

**“Eu prefiro ser esta metamorfose ambulante,
do que ter aquela velha opinião formada sobre tudo”**

Raul Seixas

“Eu não vim até aqui, pra desistir agora!”

Engenheiros do Hawaii

Este trabalho foi desenvolvido inicialmente no LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR DE FUNGOS FILAMENTOSOS, no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBiot/UFRGS) e concluído no CENTRO INTERDISCIPLINAR DE PESQUISA EM BIOTECNOLOGIA (CIP-Biotec), na Universidade Federal do Pampa (Unipampa/Campus São Gabriel).

RESUMO

Metarhizium anisopliae é um fungo entomopatogênico biocontrolador capaz de infectar uma vasta gama de artrópodes, sendo microrganismo modelo para estudos de interação patógeno-hospedeiro. Este fungo infecta seus hospedeiros de forma direta através da cutícula valendo-se de um processo multifatorial envolvendo pressão mecânica e secreção de hidrolases. No processo infectivo, ao atingir a hemolinfa do hospedeiro, as hifas se diferenciam em células ovaladas (blastosporos) que facilitam a difusão do fungo sendo a principal fonte de carbono presente na hemolinfa dos insetos o dissacarídeo trealose. Assim, para permitir a utilização da trealose como nutriente, uma importante hidrolase fúngica é secretada, a trealase ácida (EC. 3.2.1.28). Em uma análise genômica, um ortólogo putativo do gene que codifica para uma trealase ácida (ATM1) foi identificado em *M. anisopliae*. Porém, existem poucos relatos sobre estudos com elementos de regulação compreendidos no promotor destes genes. É sugerido, apenas, que devem haver elementos de repressão catabólica por glicose, bem como elementos responsivos a trealose. Um promotor é considerado regulável quando depende das condições ambientais ou genéticas para promover a indução ou repressão da síntese de mRNA do gene que o sucede. Vetores induzíveis são ferramentas que possibilitam a regulação do promotor e permitem melhor controle da expressão gênica. Até o momento, dois promotores homólogos foram descritos para *M. anisopliae* (PTef e P_{Ma-icl}), sendo ambos considerados de natureza constitutiva em condições predefinidas. O promotor da trealase ácida foi descrito por regular o gene a jusante induzindo sua expressão apenas na hemolinfa de hospedeiros e seu potencial de regulação permite uma otimização da expressão de genes de interesse a serem analisados. Com base nisso, este trabalho objetivou isolar a região promotora do gene da trealase ácida de *M. anisopliae* e elaborar potenciais vetores reguláveis por fonte de carbono. Isolaram-se, por PCR, diferentes fragmentos do promotor (1.540, 750 e 500 pb) a fim de identificar a região promotora mínima funcional da trealase ácida de *M. anisopliae*, e estes foram utilizados na construção de vetores para expressão regulável de genes repórter (GFP – Proteína Verde Fluorescente e yeCherry – Proteína Vermelho Fluorescente) através de sucessivas clonagens e subclonagens. Após obtenção dos construtos, estes foram integrados ao genoma de *M. anisopliae* por agrotransformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Os construtos foram obtidos com sucesso e houve alta taxa de transformantes positivos isolados por se tratar de recombinação ectópica do genoma do fungo.

Palavras-chave: Promotor. Trealose. Indução. Repressão. *Metarhizium anisopliae*.

ABSTRACT

Metarhizium anisopliae is an entomopathogenic biocontrol fungus capable of infecting a wide range of arthropods, and a microorganism model for host-pathogen interaction studies. This fungus infects its hosts directly through the cuticle making use of a multifactorial process involving mechanical pressure and hydrolases secretion. In the infective process, upon reaching the hemolymph of the host, hyphae differentiate into oval cells (blastospores) which facilitate the spread of the fungus being the main source of carbon present in the hemolymph of insects is the disaccharide trehalose. Thus, to allow the use of trehalose as a nutrient, an important fungal hydrolase, acid trehalase (EC. 3.2.1.28), is secreted. In a genomic analysis, a putative ortholog of the gene encoding an acid trehalase (ATM1) was identified in *M. anisopliae*. However, there are few reports on studies with regulatory elements included in the promoter of these genes. It is suggested only that there must be evidence of catabolite repression by glucose and trehalose responsive elements. A promoter is considered to be regulated when dependent on environmental or genetic conditions to promote the induction or repression of gene mRNA synthesis succeeds. Inducible vectors are tools that enable the promoter regulation and allow better control of gene expression. To date, two homologous promoters have been described for *M. anisopliae* (PTef and P_{Ma-icl}), both considered constitutive nature in predefined conditions. The promoter from the acid trehalase has been described to regulate downstream gene expression induced only in the hemolymph and its regulated nature allows an optimization of the expression of genes of interest. Based on this, this paper aims to isolate the promoter region of the acid trehalase gene of *M. anisopliae* and develop potential vectors adjustable by carbon source. Different promoter fragments were isolated by PCR (1540, 750 and 500 bp) in order to identify the functional minimal promoter region of *M. anisopliae* acid trehalase and these were used in the construction of vectors for controlled expression of reporter genes (GFP - green fluorescent protein and yeCherry - red fluorescent protein) through successive cloning and subcloning techniques. After obtaining the constructs, these were integrated into the genome of *M. anisopliae* via agrotransformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The constructs were obtained successfully and there was a high rate of positive transformants isolated due to ectopic recombination in the fungus genome.

Keywords: Promoter. Trehalose. Induction. Repression. *Metarhizium anisopliae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da região promotora putativa da trealase ácida de <i>Metarhizium anisopliae</i> e a estratégia para sua caracterização.....	25
Figura 2. Modelo esquemático e confirmação das construções GFP em pUC18	29
Figura 3. Modelo esquemático e confirmação das construções yeCherry em pUC18	30
Figura 4. Modelo esquemático e confirmação das construções GFP::BAR em pPZP.....	31
Figura 5. Modelo esquemático e confirmação das construções yeCherry::BAR em pPZP.....	32
Figura 6. Triagem por PCR da presença do gene repórter nos potenciais transformantes.....	34
Figura 7. Observações preliminares de indução/repressão do entomopatógeno transformado com o cassette de expressão TreaGB.	37

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1. Lista das principais enzimas utilizadas neste estudo e sua empresa de origem....	23
Quadro 2. Lista de <i>primers</i> utilizados.....	24
Quadro 3. Lista de <i>cassettes</i> construídos neste estudo.....	26
Tabela 1. Relação de isolados por agrotransformação.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus Celsius
DNA	ácido desoxirribonucleico
%	porcento
MC	meio de Cove
MCc	meio de Cove completo
LB	meio Lúria-Bertani
min	minutos
m/V	massa por volume
mL	mililitros
µl	microlitros
nt	nucleotídeos
h	horas
pb	pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase quantitativa)
RPM	rotações por minuto
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 <i>Metarhizium anisopliae</i>	17
2.2 Metabolização da Trealose.....	18
2.3 Sistema de expressão em fungos	19
2.4 Promotor do Gene da Trealase Ácida.....	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	21
4.1 Material Biológico.....	21
4.2 Meios de cultivo e manipulação para <i>M. anisopliae</i>	22
4.3 Meios de Cultivo e Manipulação para <i>E. coli</i>	22
4.4 Manipulação de Ácidos Nucléicos	22
4.5 Soluções e Enzimas Utilizadas.....	23
4.6 Isolamento da Região Promotora	23
4.7 Construção dos <i>cassettes</i>	24
4.8 Construção dos <i>cassettes</i> para Agrotransformação	27
4.9 Agrotransformação de <i>M. anisopliae</i>	27
4.10 Triagem e confirmação da inserção dos <i>cassettes</i>	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Construções dos <i>cassettes</i>	28
5.2 Agrotransformação de <i>M. anisopliae</i>	33
6. CONCLUSÕES	35
7. PERSPECTIVAS	37
REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

Uma ferramenta importante na investigação de genes e suas funções é a disponibilidade de promotores fortes e passíveis de regulação para elaboração de vetores de expressão. Tais vetores são necessários para, por exemplo, a elucidação de funções isoladas de genes, metodologias de superexpressão e para estudar a relação existente de genes com processos biológicos (GARÍ *et al.*, 1997; ST LEGER *et al.*, 1996; FRANCHESCHINI, 2005). A pesquisa de regiões promotoras para elaboração de vetores eficientes têm forte contribuição na ciência, a citar os promotores dos genes *Pmagpd* e *Tef-1 α* (NAKAZATO *et al.*, 2006; CAO *et al.*, 2011).

Microrganismos controladores de pragas de interesse econômico são constantes alvos de estudo, como o fungo filamentosso *M. anisopliae*, e cada vez mais busca-se tornar tais microrganismos mais virulentos. Entretanto, para torná-los mais eficientes no controle de pragas, o entendimento da função de genes importantes para a patogenia se torna necessário e vetores aperfeiçoados com promotores regulados facilitam este processo.

Segundo Felix (2010), com a utilização de promotores reguláveis para estudos gênicos, mesmo depois de inativado o promotor, a proteína que já foi expressa persiste na célula e, portanto, o fenótipo pode continuar por várias horas dependendo da meia vida da proteína de estudo. Desta maneira, é importante o conhecimento da localização da proteína expressa, observada a constante polêmica relatada em mídias, por exemplo, sobre os transgênicos. Conhecida a etapa e local exato que se encontra a proteína inserida, talvez facilitaria, por exemplo, a liberação e posterior identificação no meio ambiente dos microrganismos transformados pois, se teria um melhor controle da expressão do gene estudado. Este seria o caso do promotor em estudo neste trabalho: determinadas proteínas exógenas seriam apenas expressas e secretadas na hemolinfa do hospedeiro.

No presente trabalho, buscou-se isolar e caracterizar a região promotora responsável por regular o gene da trealase ácida do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* no intuito de utilizá-la para obtenção de vetores de expressão reguláveis por fontes de carbono, tendo os genes que codificam a GFP e yeCherry como repórter. Este estudo objetiva contribuir de forma mais eficiente em elucidações de questões envolvendo genes de interesse permitindo um melhor controle da indução/repressão dos mesmos em local já conhecido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Metarhizium anisopliae*

Inicialmente isolado e descrito por Metschnikoff em 1879, este fungo filamentosso possui a capacidade de infectar e ser letal a cerca de 300 espécies de artrópodes abrangendo de insetos a ácaros e possui uma distribuição geográfica mundial (ROBERTS & ST. LEGER, 2004). Este fungo foi descrito por infectar insetos praga de interesse econômico na agricultura e pecuária como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Schistocerca gregaria*, *Manduca sexta*, além de vetores de doenças tais como *Aedes aegypti*, *Triatoma infestans*, *Glossina sp.* (KAAYA & MUNYINYI, 1995; LUZ *et al.*, 1998; SCHOLTE *et al.*, 2007; FRAZZON *et al.*, 2000; TOUNOU *et al.*, 2008; DUAN *et al.*, 2009).

Por estas razões *M. anisopliae* é considerado modelo de estudo das interações patógeno-hospedeiro e é amplamente utilizado como agente biocontrolador de pragas. Valer-se de biocontrole, dentre outras vantagens, reduz a probabilidade dos insetos adquirirem resistência, se comparado aos pesticidas, devido ao processo multifatorial infectivo (HE & XIA, 2008).

De forma eficiente *M. anisopliae* desenvolveu mecanismos de infecção para contornar as defesas de seus hospedeiros. O ciclo de infecção deste fungo é bem descrito e basicamente compreende as etapas de adesão dos esporos à cutícula de seu hospedeiro, a germinação deste esporo, diferenciação em apressórios, penetração da cutícula, colonização da hemolinfa com a diferenciação em blastosporos, extrusão de novos corpos hifais e disseminação dos conídios formados para nova infecção (ARRUDA *et al.*, 2005).

M. anisopliae apresenta fatores de virulência que atuam em duas etapas principais: na adesão e penetração através da cutícula do hospedeiro e nas alterações morfo-fisiológicas com consequente desenvolvimento em blastosporos na hemolinfa do inseto. A adesina MAD1, as hidrofobinas e as lipases são exemplos de fatores importantes para adesão do fungo à cutícula de seus hospedeiros (WANG & ST. LEGER, 2007; WESSELS, 2000; SILVA *et al.*, 2009). A penetração deste fungo se dá de forma direta por pressão mecânica e secreção de hidrolases, algumas determinantes para virulência como proteases e quitinases (CLARKSON & CHARNLEY, 1996; BOLDO *et al.*, 2009; ST. LEGER *et al.*, 1987). Wang e St. Leger (2007) descrevem uma perilipina envolvida na geração da pressão osmótica durante o processo de infecção.

Atingindo a hemolinfa, os blastosporos promovem a disseminação e burlam o sistema imune do hospedeiro (ZHANG & XIA, 2009). Para nutrir-se dos nutrientes encontrados na hemolinfa, uma importante hidrolase é secretada em grandes quantidades, a trealase ácida, tratando-se de uma adaptação do fungo em relação ao hospedeiro, visto que o açúcar mais abundante (90 %) na hemolinfa é a trealose. A depleção da trealose na hemolinfa é danosa ao inseto, já que é fonte energética e regula a pressão osmótica. Foi mostrado ainda a detecção de trealase na hemolinfa de gafanhotos da espécie *Locusta migratoria manilensis* quando infectados por *M. acridum* (ZHAO *et al.*, 2006; XIA *et al.*, 2002).

2.2 Metabolização da Trealose

A trealose é um dissacarídeo formado por dois resíduos de alfa glicose não redutor, um carboidrato encontrado em vários organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas, insetos e alguns invertebrados (ELBEIN, 1974). A trealose é encontrada em diversos organismos capazes de resistir à desidratação completa, conhecido por anidrobiose, comum em tardígrados, nematóides, células de leveduras e esporos de fungos (CROWE *et al.*, 1998).

Na maioria dos fungos, assim como em *Saccharomyces cerevisiae*, a trealose é hidrolisada por basicamente duas trealases (E.C.3.2.1.28), que se diferenciam dependendo do tipo de regulação, localização e propriedades catalíticas: a trealase neutra, exibindo atividade máxima em pH neutro (6,7 a 7,0), citoplasmática, de menor estabilidade térmica, ativada por Ca^{2+} e Mn^{2+} , dependente de fosforilação via cAMP e responsável pela hidrólise da trealose intracelular; e a trealase ácida, responsável pela hidrólise da trealase externa, considerada mais estável e altamente específica, com pH ótimo entre 4,5 a 5,0. Em *S. cerevisiae*, esta enzima está localizada nos vacúolos e sua atividade é independente de cátions bivalentes (THEVELEIN, 1988; DESTRUELLE *et al.*, 1995; XIA *et al.*, 2002; AQUINO *et al.*, 2005). Já foram descritas trealases em *S. cerevisiae*, *Candida sp.*, *Metarhizium sp.*, *Beauveria sp.*, dentre outros (NWAKA *et al.*, 1996; ROY *et al.*, 2001; GARRÉ *et al.*, 2008; SÁNCHEZ *et al.*, 2009; VEISOVA *et al.*, 2012).

Observou-se que ao longo do ciclo de crescimento de *S. cerevisiae* as enzimas apresentam padrões de atividade distintos. Durante a fase de crescimento celular exponencial com açúcares fermentáveis, tais como glicose, manose ou galactose, a atividade da trealase citosólica é aumentada, todavia, tem-se a queda desta atividade conforme a célula entra na fase estacionária ou em culturas que cresceram com substratos respiráveis (glicerol e etanol),

por exemplo. Entretanto, na fase estacionária, a trealase ácida passa a ter uma maior atividade observada, indicando que está sujeita a repressão catabólica por glicose (SAN MIGUEL, 1994). Também em *C. albicans* observou-se que a atividade da trealase celular durante o catabolismo da trealose atingiu valores três vezes maiores dos observados durante o crescimento em glicose (ZILLI, 2006).

2.3 Sistema de expressão em fungos

Em fungos filamentosos, os vetores de expressão são, geralmente, plasmídeos que foram construídos apresentando características em comum no *cassette* de expressão: a sequência promotora, sequência codante e sequência terminadora (BERKA, 1989). O primeiro vetor de expressão utilizado em *M. anisopliae* foi o plasmídeo pNOM102 (ST LEGER *et al.*, 1995), contendo o gene que codifica para β -glicuronidase (*gusA*) de *Escherichia coli*, utilizado como marcador molecular para estudos microbiológicos ambientais. Este gene está sob controle do promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato (*PgpdA*) e a região terminadora do gene *trpC* (*TtrpC*) de *Aspergillus nidulans*. Outros vetores, como pMAPR-1 e p324-Chit1, com os mesmos elementos de regulação também são citados na literatura (MULLAMEY *et al.*, 1985; PUNT *et al.*, 1990; ST LEGER *et al.*, 1996; SCREEN *et al.*, 2001; FANG *et al.*, 2009).

A região promotora do gene *gapdh* do fungo *Cryphonectria parasitica* foi utilizada em estudo de campo utilizando *M. anisopliae* para avaliar a capacidade de permanecer e se estabelecer na rizosfera. Neste estudo, o fungo expressava GFP (HU & ST LEGER, 2002). Inglis *et al.* (2000), descreve a transformação de *M. acridum* utilizando o plasmídeo pEGFP que carrega, além da sequência repórter para proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria* (GFP), uma modificação, tendo sequências teloméricas repetitivas de *Fusarium oxysporum* e mostra que, dos transformantes obtidos, houve inserções tanto em regiões não teloméricas como em regiões teloméricas.

Nakazato *et al.* (2006) utiliza pela primeira vez em *M. anisopliae* o promotor homólogo e constitutivo do gene do fator de alongamento de tradução 1 α (*tef1- α*) tendo por genes repórter GFP e BAR expressando os fenótipos de fluorescência e resistência a glifosinato de amônio respectivamente. Mais tarde, Boldo *et al.* (2009) também utilizam para a construção do *cassette* de superexpressão do gene *chi2* o promotor do gene *tef1- α* e terminador *trpC*.

Recentemente foi descrito a utilização do promotor gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Pmagpd) de *M. acridum*, que, comparado com Pgpda de *Aspergillus nidulans*, apresentava menor sequência e atividade significativamente maior em *M. acridum* (CAO *et al.*, 2011). Estudos foram realizados, também, com o promotor do gene de isocitrato liase de *M. anisopliae* (*Ma-icl*) usando como marcador a proteína fluorescente vermelha mCherry (PADILLA-GUERRERO *et al.*, 2011).

Como foi mostrado, o uso de sistemas de expressão em fungos é de longa data utilizado para diversas abordagens desde uma sondagem funcional à utilização destes sistemas para manipulação genética. Em *M. anisopliae*, contudo, percebe-se a falta de estudos com regiões promotoras homólogas eficientes e a utilização destas na construção de sistemas de expressão que facilitariam tais abordagens. Os dois promotores descritos para serem homólogos de *M. anisopliae* até o momento são os mencionados anteriormente PTef (Nakazato *et al.*, 2006) e P*Ma-icl* (PADILLA-GUERRERO *et al.*, 2011), ambos de caráter constitutivo. Todavia, ao buscar-se entender um gene, nem sempre é favorável que este se mantenha expresso constantemente, da mesma forma, uma deleção nem sempre é viável. Promotores reguláveis permitem um melhor controle desta expressão podendo induzir e reprimir o mesmo gene em momentos diferentes. Dá-se aí a importância de estudos com regiões promotoras de natureza regulável.

2.4 Promotor do Gene da Trealase Ácida

Há poucos estudos da região promotora do gene da trealase ácida de *M. anisopliae*. Esta região apresenta homologia com a região promotora da trealase ácida de *M. acridum* (ZHAO *et al.*, 2006), e sugere-se que deve haver elementos de repressão catabólica por glicose (NKAWA *et al.*, 1995) bem como elementos responsivos a trealose (XIA *et al.*, 2002).

Em predições computacionais realizadas por Junges (2010), foi possível detectar alguns dos elementos canônicos presentes em promotores eucarióticos. Utilizando a ferramenta FGENESH, detectou-se a presença de um potencial TATA-box localizado a 283 nucleotídeos a montante do sítio de início da tradução. À jusante deste sítio, e a 245 nt à montante do ATG, pode ser encontrado um potencial sítio de início da transcrição (SIT). Foi detectada, ainda, a sequência CAAT-box, sítio de ligação ao fator de transcrição C/EBP (CAATT-box/*Enhancer Binding Protein*). O estudo demonstra ainda a presença de três sítios de ligação ao fator CREA (CCCCA/GC) preditos, o qual medeia a repressão catabólica por

fonte de carbono, localizados a 575 nt a montante do SIT na fita senso e a 540 nt e 75 nt a montante do SIT na fita anti-senso

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Com base nos dados apresentados até o presente momento, este trabalho objetivou identificar e analisar a região promotora do gene da trealase ácida de *M. anisopliae*, e sua potencial utilização para elaboração de vetores reguláveis por fonte de carbono.

3.2 Objetivos Específicos

- i. Isolar diferentes comprimentos da região promotora do gene da trealase ácida de *M. anisopliae*;
- ii. Construir vetores de expressão para os genes repórteres GFP e yeCherry sob regulação dos fragmentos promotores isolados;
- iii. Realizar agrotransformação de *M. anisopliae* com os vetores gerados.

4. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Material Biológico

A linhagem selvagem *M. anisopliae* var. *anisopliae* E6 utilizada nos experimentos foi originalmente isolada de *Deois flavopicta* (Homoptera: Cercopidea) no estado do Espírito Santo, Brasil, e gentilmente cedida pelo Prof. João Lúcio Azevedo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP).

Células de *E. coli*, linhagem TG2 e DH5 α foram preparadas para eletrocompetência ou quimiocompetência e utilizadas como hospedeiras dos vetores construídos neste estudo.

Foram utilizados a linhagem EHA105 de *A. tumefaciens* e o vetor binário pPZP201BK neste trabalho em protocolos de agrotransformação. As células EHA105 foram preparadas para quimiocompetência.

4.2 Meios de cultivo e manipulação para *M. anisopliae*

Os meios de cultivo utilizados neste trabalho para repiques e manutenção de *M. anisopliae* foram: Meio de Cove completo (MCc) [glicose 1%, nitrato de sódio 0,6%, casaminoácidos 0,15%, extrato de levedura 0,05%, peptona 0,2%] e Meio de Cove (MC) [glicose 1%, nitrato de sódio 0,6%]. Estes meios são acrescidos no momento de uso de: 2% de Solução de Sais [KCl 2,6%, MgSO₄.7H₂O 2,6% e KH₂PO₄ 7,6 % (m/V)] e 0,04% de Solução de Elementos Traços [NaB₄O₇.7H₂O 0,004 %, CuSO₄.5H₂O 0,04 %, FeSO₄ 0,0001 %, MnSO₄ 0,08 %, NaMo₄.2H₂O 0,08 % e ZnSO₄.7H₂O 0,08 % (m/V)]. Meios sólidos são acrescidos de 1,5% de ágar. Para suspensões de esporos do fungo, utilizou-se 3 mL de Tween-80 diluído em água destilada a 0,01% estéril para cada placa de Petri contendo *M. anisopliae* esporulado em MCc; centrifugações e lavagens com água destilada estéril; ressuspensão dos esporos em 1 mL e contagem da diluição foi feita com auxílio da câmara de Neubauer. Todos os cultivos fúngicos foram mantidos a 28°C.

4.3 Meios de Cultivo e Manipulação para *E. coli*

Inóculos, repiques e manutenção de células de *E. coli* foram efetuados em Meio Luria-Bertani (LB) [triptona 1%, extrato de levedura 5%, NaCl 1% (m/V)]. Aos meios sólidos foram acrescidos 1,5% de ágar. Todos foram mantidos a 37°C.

4.4 Manipulação de Ácidos Nucléicos

Mini-preparações de DNA plasmidial a partir de *E. coli* por lise alcalina foram conduzidas como descrito por Sambrook & Russel (2001). Midi-preparações foram preparadas por purificação em matriz de sílica gel conforme protocolo fornecido pelo fabricante (*Invitrogen*-PureLink® HiPure Plasmid Midiprep Kit). Extração de DNA fúngico foi realizada a partir de micélio conforme protocolo estabelecido por Nakazato et al. (2006). A extração de DNA de esporos em micro-ondas foi realizada da seguinte forma: uma alçada de esporos foi retirada de placas esporuladas de *M. anisopliae* e adicionada em tubos Eppendorf de 0,5 mL com furo na tampa. Os Eppendorfs permaneceram, juntamente com um Béquer de 0,5 L de água, por 20 min em potência máxima. Após os 20 min, 30 µl de tampão T.E. foram acrescidos ao tubo. Os

tubos passaram por vórtex 30-40 segundos, eram então centrifugados por 5 min a 14.000 rpm e o sobrenadante removido para novos tubos. Foi realizada diluição 1:10 e desta 1 µl era utilizado como molde para reação da PCR.

4.5 Soluções e Enzimas Utilizadas

As soluções e tampões foram preparados segundo Sambrook & Russell (2001), utilizando água destilada ou MilliQ autoclavadas. As enzimas de restrição e de modificação foram obtidas das empresas *Fermentas*, *Invitrogen* e *New England Biolabs* (Quadro 1), sendo utilizadas conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

Quadro 1. Lista das principais enzimas utilizadas neste estudo e sua empresa de origem.

Enzima	Origem
<i>EcoRI</i>	<i>Promega</i>
<i>KpnI</i>	<i>BioLab/Fermentas</i>
<i>BamHI</i>	<i>Promega</i>
<i>XbaI</i>	<i>Promega</i>
<i>StuI</i>	<i>Promega</i>
<i>SmaI</i>	<i>Promega</i>
Taq DNA polimerase	<i>Invitrogen</i>
T4 DNA Ligase	<i>Invitrogen</i>
<i>Klenow</i>	<i>Fermentas/Invitrogen</i>
T4 PNK	<i>Fermentas</i>
SAP	<i>Invitrogen</i>

4.6 Isolamento da Região Promotora

Após crescimento do fungo em meio MCc líquido o DNA foi extraído a partir do micélio e utilizado como molde para o isolamento da região de interesse por PCR. Para isolar a região promotora putativa do gene da trealase ácida, três *primers* diretos e um reverso foram desenhados (Quadro 2). Para fins de uso posterior em clonagem, estes *primers* possuem sítios para as enzimas de restrição *KpnI* e *EcoRI* em suas extremidades (sublinhado no Quadro 2). As reações de PCR foram realizadas utilizando Taq DNA polimerase de alta fidelidade (*Invitrogen*). Optou-se por isolar três tamanhos de fragmentos promotores, objetivando identificar a sequência mínima funcional promotora, sendo 1.540 pb, 750 pb e 500 pb. Para a

região de 1.540 pb utilizou-se o *primer forward* PTreaFor, para o fragmento de 750 pb o *primer* utilizado foi PTrea750For e para a amplificação da região de 500 pb usou-se o *primer* PTrea500For. Para as três reações de amplificação o *primer* reverso foi o PTreaRev. Estes primers amplificam uma sequência a montante da região codante da trealase ácida (ATM1) conforme esquematizado (Figura 1).

Quadro 2 - Lista de *Primers* utilizados

Primer	Sequência (5' - 3')*	Utilização
PTreaFor	<u>GAATTCT</u> GCGCCATACCGA GAGCTGC	Amplificação da região promotora da trealase ácida de 1.540 pb
PTrea750For	<u>GAATTC</u> CGGTTGGCGATAA GAGA	Amplificação da região promotora da trealase ácida de 750 pb
PTrea500For	<u>GAATTC</u> CCAGCACAGCTTG TTGAG	Amplificação da região promotora da trealase ácida de 500 pb
PTreaRev	<u>GGTACCG</u> TTGCGAGTCCCG GGCTCGA	Amplificação da região promotora da trealase ácida
yeCherryFor	<u>GGTACCA</u> CTAGTATGGTAA GTAAG	Amplificação da região codante do gene repórter yeCherry
yeCherryRev	<u>GGATCC</u> TTATTTGTA CAATTCGTC	Amplificação da região codante do gene repórter yeCherry
GFP_CDS_A	<u>GGATCC</u> GGGTTACTTGTAC AGCTCG	Amplificação da região codante do gene repórter GFP
GFP_CDS_S	<u>GGATCC</u> GGAATGGTGAGCA AGGGCG	Amplificação da região codante do gene repórter GFP
GFP_Rfusion	CTGCAGGATTACCTCTAAA <u>CAAGTGTACCTGTGCAT</u>	Amplificação dos <i>cassettes</i> Trea::yeCherry::TrpC

* A região sublinhada de cada *primer* representa o sítio de clivagem das enzimas de restrição utilizadas.

Fonte: WEYH, 2015

4.7 Construção dos *cassettes*

Neste estudo, optou-se por manter como gene repórter dos constructos a região codante da proteína fluorescente verde (GFP), ou a região codante da proteína vermelho fluorescente (yeCherry), esta última devido à sua melhor estabilidade.

Os fragmentos promotores amplificados por PCR foram purificados a partir de gel de agarose com o quite de purificação de ácidos nucleicos PureLink (*Life Technologies*), em seguida clonados em vetor pUC18 clivado com as mesmas enzimas de restrição contidas em suas extremidades (*EcoRI* e *KpnI*). As construções foram confirmadas por clivagem e PCR.

Quadro 3 - Lista de cassettes construídos neste estudo.

Nome da Construção	Construção
TreaG	PTrea::GFP::TrpC
TreaG750	PTrea750::GFP::TrpC
TreaG500	PTrea500::GFP::TrpC
Trea_yeC	PTrea::yeCherry::TrpC
Trea_yeC750	PTrea750::yeCherry::TrpC
Trea_yeC500	PTrea500::yeCherry::TrpC
TreaGB	pPZP::BAR::PTrea::GFP
Trea750GB	pPZP::BAR::PTrea750::GFP
Trea500GB	pPZP::BAR::PTrea500::GFP
Trea_yeCB	pPZP::BAR::PTrea::yeCherry
Trea750_yeCB	pPZP::BAR::PTrea750::yeCherry
Trea500_yeCB	pPZP::BAR::PTrea500::yeCherry

Fonte: WEYH, 2015

Para amplificação da região codante de yeCherry, utilizou-se como molde o plasmídeo YAP1 mantido no laboratório do CBiot/UFRGS e os oligonucleotídeos yeCherryFor e yeCherryRev contendo sítios para as enzimas de restrição *KpnI* e *BamHI* (Quadro 2). O fragmento amplificado foi purificado, clonado em pUC18 e após confirmado, foi novamente clivado com as enzimas *KpnI* e *BamHI* para ser purificado, agora contendo as regiões para subclonagem coesiva.

Os vetores contendo o *cassette* para a expressão de GFP foram clivados com *KpnI* e *BamHI* para posterior substituição da região codante repórter GFP pela yeCherry. As construções realizadas neste estudo totalizaram seis diferentes *cassettes*: três que possuem GFP como gene repórter e três que possuem yeCherry. Portanto, cada tamanho de fragmento promotor em estudo apresenta duas construções com genes repórter diferentes, conforme demonstrado nas Figuras 2 e 3. Os vetores yeCherry foram nomeados Trea_yeC (para o fragmento promotor de 1.540 pb), Trea750_yeC (750 pb) e Trea500_yeC (500 pb) (Quadro 3).

4.8 Construção dos *cassettes* para Agrotransformação

Os *cassettes* expressando GFP foram isolados de pUC18 por clivagem com as enzimas *EcoRI* e *XbaI*, purificados, e subclonados em vetor pPZP::BAR préclivado com as mesmas enzimas. O vetor pPZP::BAR contém a sequência responsável por conferir resistência a herbicidas que apresentam como princípio ativo glifosinato de amônio e codifica uma fosfinotricina acetiltransferase (PAT), servindo de marcador de seleção de transformantes. Estes vetores passaram a ser chamados TreaGB, Trea750GB e Trea500GB para os promotores PTrea de 1.540, 750 e 500 pb respectivamente conforme demonstrado na Figura 4 e Quadro 3.

Nos *cassettes* para promover a expressão de yeCherry, o isolamento da região de interesse foi realizado por amplificação com os *primers* senso da região promotora de interesse e com o *primer* antisenseo GFP-Rfusion (ver Quadro 2) que anela no final do terminador TrpC. O *cassette* amplificado foi purificado, tratado com as enzimas de modificação *Klenow* e T4 DNA polimerase (*Fermentas*) para então ser subclonado em vetor pPZP::BAR préclivado com *StuI*, de sítio único, e tratado com a enzima SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas*).

Estes vetores, após confirmação por PCR e clivagem, passaram a ser chamados Trea_yeCB (para o fragmento promotor de 1.540 pb) Trea750_yeCB (para 750 pb) e Trea500_yeCB (500 pb) conforme demonstrado na Figura 5 e Quadro 3.

Os vetores construídos, foram então, transformados por eletroporação ou quimiotransformação em células de *Agrobacterium tumefaciens* eletrocompetentes ou quimiocompetentes e reconfirmados por clivagem da extração de DNA plasmidial.

4.9 Agrotransformação de *M. anisopliae*

A transformação de *M. anisopliae* mediada por *A. tumefaciens* foi realizada conforme descrito anteriormente (STAATS *et al.*, 2007). Basicamente, a linhagem de *A. tumefaciens* contendo o vetor binário recombinante gerado foi co-cultivada com *M. anisopliae* em igual proporção. Utilizou-se acetoseringona (200 µM) para permitir a indução dos genes de virulência da bactéria. As linhagens transformantes se caracterizam pela inserção do *cassette* de expressão: gene repórter e do gene de resistência a glifosinato de amônio. A inserção ocorre geralmente em cópia única em regiões aleatórias do DNA do fungo. Após o período do co-cultivo, adicionou-se sobre este aproximadamente 10 mL de MC (Meio de Cove) acrescido de 200 µg/mL de glifosinato de amônio seguido de outro período de incubação em torno de

10-15 dias a 28 °C. As placas foram observadas diariamente para o aparecimento de transformantes. Conforme os transformantes surgiam, foram isolados em placas com meio sólido MC mantendo a seleção com glifosinato de amônio. Atingindo a esporulação, os transformantes passam por triagens através da PCR utilizando-se os *primers* para amplificação do gene repórter e microscopia de fluorescência.

4.10 Triagem e confirmação da inserção dos cassettes

Para confirmação da inserção dos *cassettes* nos transformantes gerados, foi realizada extração de DNA de esporos por micro-ondas (item 4.4.) seguido da PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores que amplificam os genes repórter (GFP e yeCherry). Transformantes que apresentaram amplificação positiva na primeira triagem foram cultivados em meio MCc para proceder com extração de DNA micelial. Após extração, esta foi utilizada como molde de nova PCR para amplificação das mesmas regiões previamente utilizadas. Outra forma de triagem realizada em paralelo à PCR foi a observação da fluorescência emitida das hifas e esporos dos transformantes positivos para amplificação.

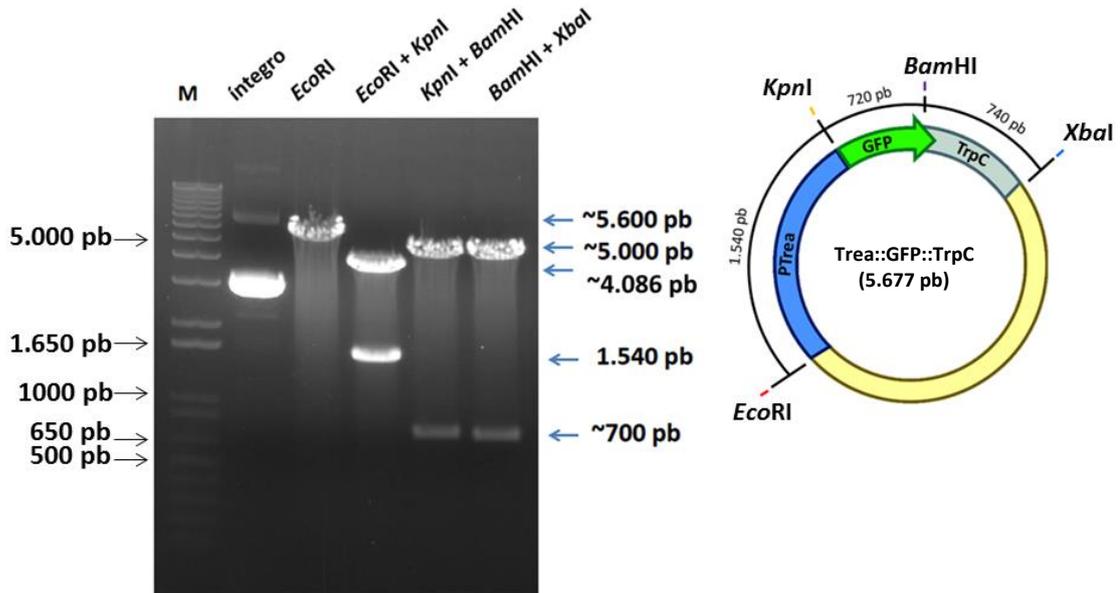
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construções dos cassettes

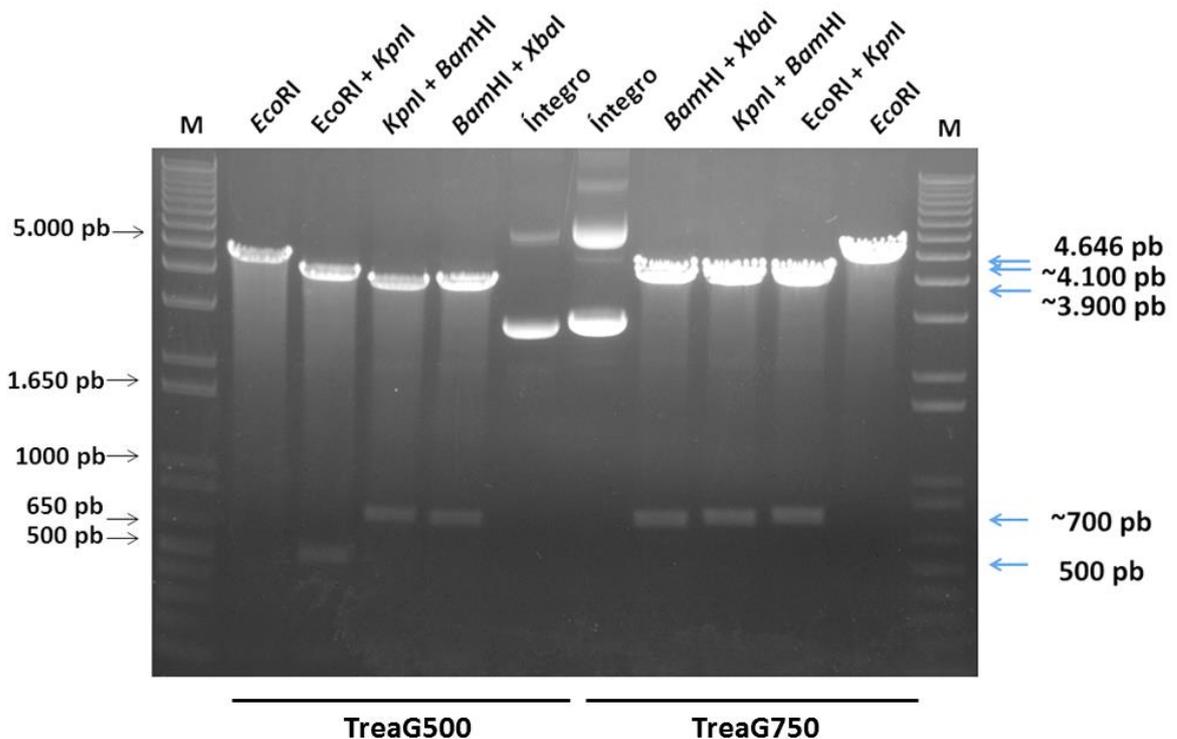
O fungo *M. anisopliae* foi cultivado em MCc líquido a fim de se obter micélio para extração de DNA genômico por método padrão de fenol e clorofórmio conforme descrito anteriormente (NAKAZATO *et al.*, 2006). O DNA foi utilizado como molde nas reações de PCR para amplificação dos fragmentos promotores. Após obtenção dos fragmentos, estes, foram clonados em vetor pUC18 e confirmados por clivagem com as enzimas de restrição *EcoRI* e *KpnI* clivando nas extremidades do fragmento promotor clonado. A estes vetores pUC18::PTrea foram adicionados, por subclonagem, os fragmentos do gene repórter GFP e terminador TrpC, também confirmados por clivagem com enzimas específicas, sendo *KpnI* na extremidade inicial de GFP e *XbaI* na extremidade final de TrpC (Figura 2).

Figura 2. Modelo esquemático e confirmação das construções GFP em pUC18. Em azul está representada a região promotora putativa da trealase ácida de *Metarhizium anisopliae* isolada, em verde a região codante da proteína verde fluorescente GFP, em cinza a região de terminação TrpC. No esquema são demonstrados os comprimentos de cada fragmento. Abaixo da nomenclatura de cada vetor gerado está seu tamanho em pb putativo. Em amarelo está representado vetor pUC18 com 2.686 pb. Sítios para enzimas de restrição são indicados no esquema. **A)** à esquerda, confirmação por clivagem enzimática do vetor Trea::GFP::TrpC e à direita, esquema da construção do vetor. **B)** confirmações por clivagem enzimática dos vetores Trea500::GFP::TrpC (à esquerda) e Trea750::GFP::TrpC (à direita). **C)** Esquemas dos construtos TreaG500 e TreaG750 mostrando os sítios enzimáticos utilizados para a construção. Marcador de DNA por tamanho em pb (DNA Ladder 1kb Plus) é representado como M.

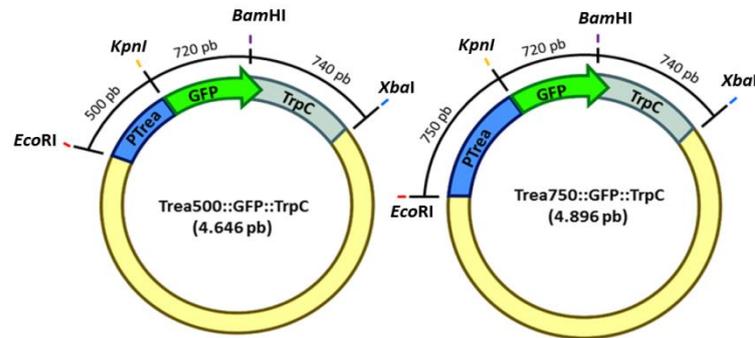
A



B



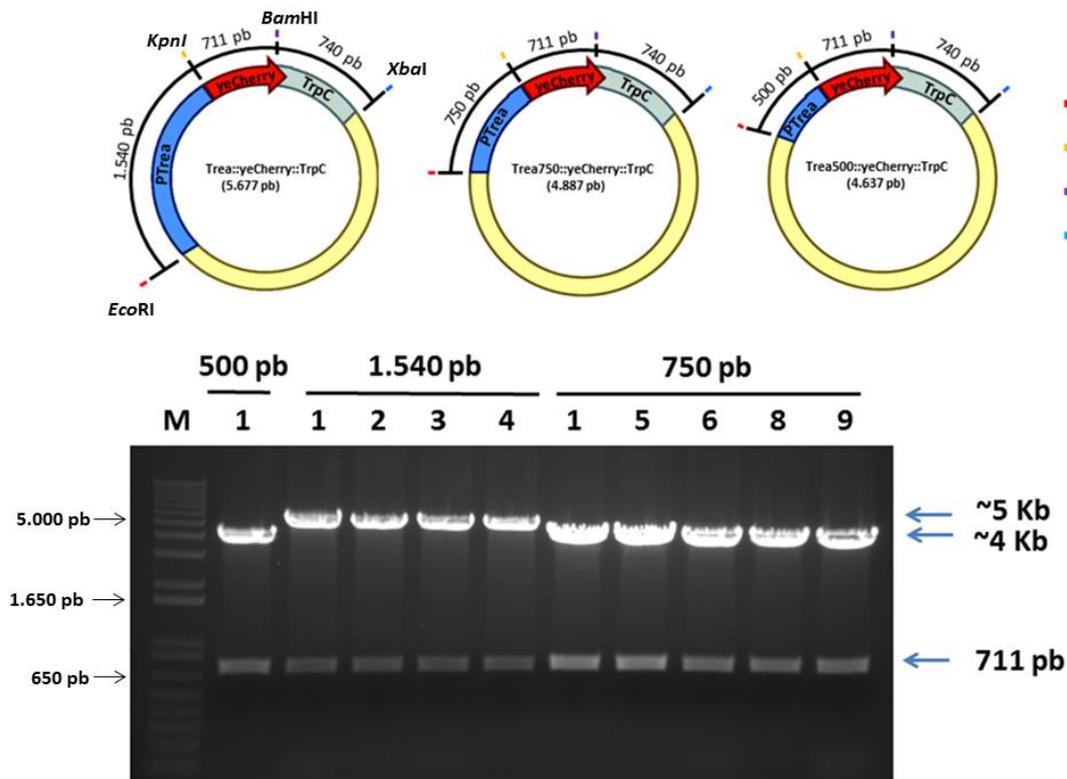
C



Fonte: WEYH, 2014

O gene repórter *yeCherry* foi amplificado por PCR usando como molde o plasmídeo YAP1. O fragmento amplificado foi clonado em pUC18 objetivando grande quantidade do mesmo, reisolado e purificado para posterior subclonagem onde substituiu GFP por clivagem com as enzimas *KpnI* e *BamHI* (Figura 3).

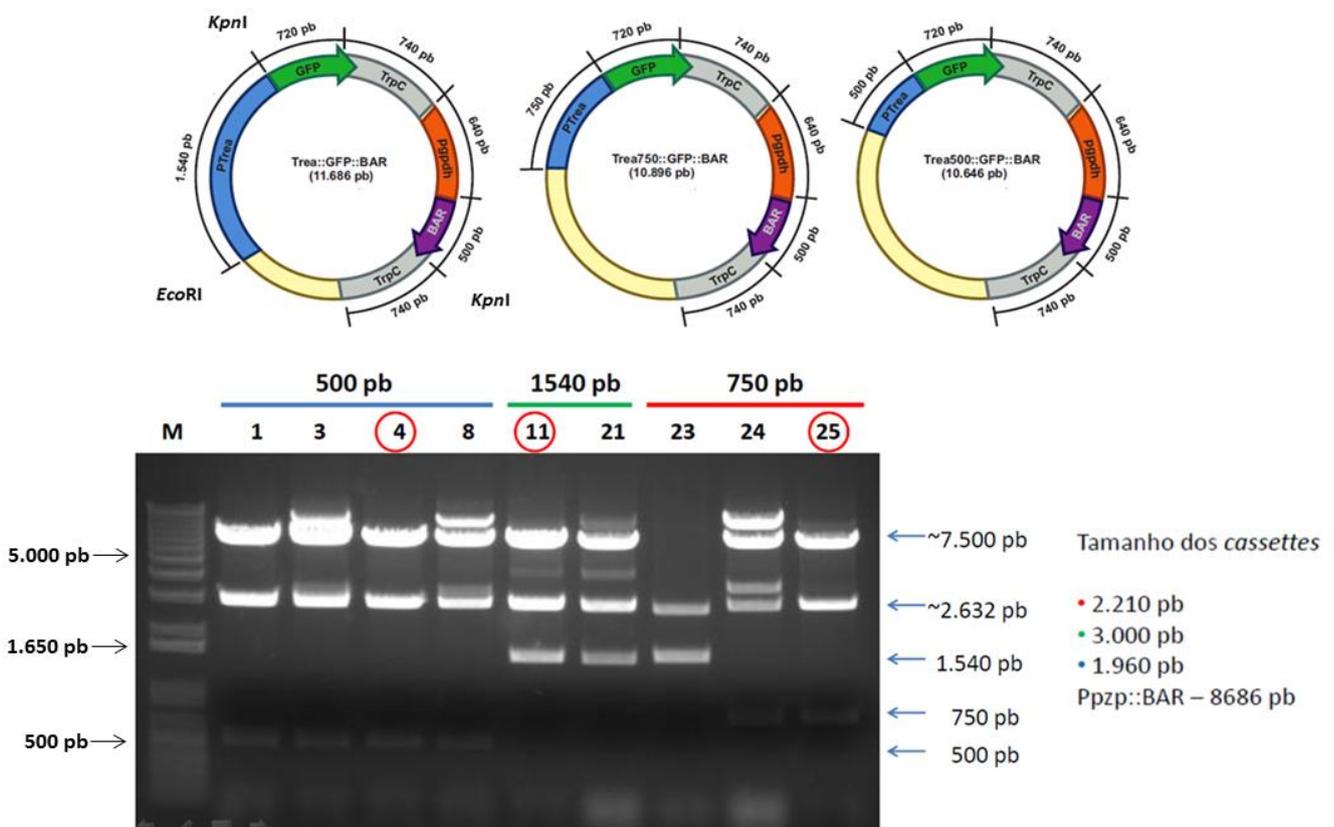
Figura 3. Modelo esquemático e confirmação das construções *yeCherry* em pUC18. Em azul está representada a região promotora putativa da trealase ácida de *Metarhizium anisopliae* isolada, em cinza a região de terminação *TrpC*, em vermelho a região codante da proteína vermelho fluorescente *yeCherry*. No esquema são demonstrados os comprimentos de cada fragmento. Abaixo da nomenclatura de cada vetor gerado está seu tamanho em pb putativo. Em amarelo está representado vetor pUC18 com 2.686 pb. Sítios para enzimas estão representados no primeiro esquema. Acima está esquematizado as construções dos vetores, abaixo é demonstrada a confirmação da construção por clivagem com o par enzimático *KpnI* e *BamHI*. Marcador de DNA por tamanho em pb (DNA Ladder 1kb Plus) é representado como M.



Fonte: WEYH, 2014

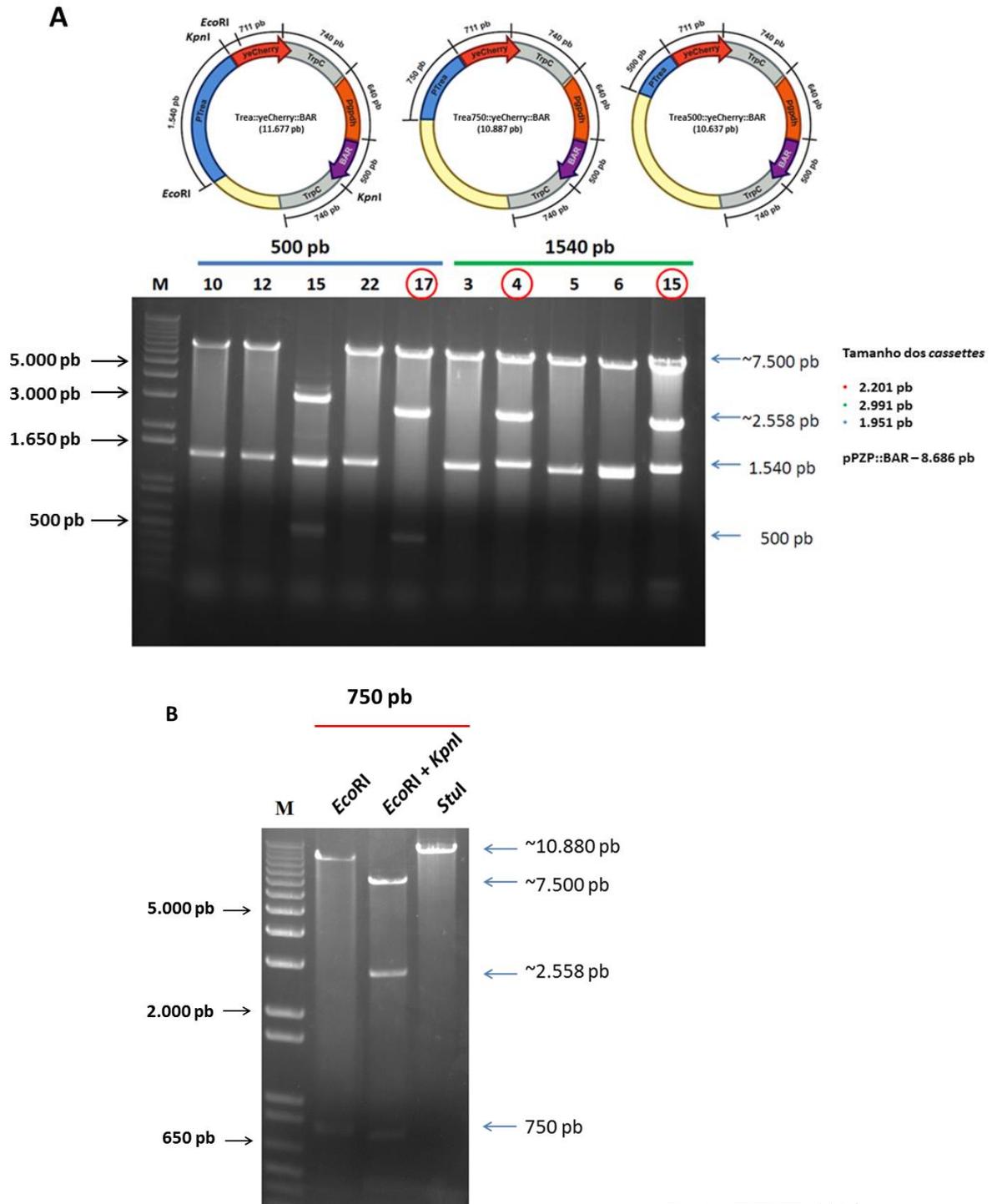
Após confirmação dos *cassettes* contendo GFP em pUC18 estes foram removidos clivando com as enzimas contidas nas extremidades *EcoRI* e *XbaI*, purificados e subclonados em vetor binário, de resistência a glifosinato de amônio, pPZP::BAR. Obtida a confirmação dos *cassettes* contendo yeCherry em pUC18, estes foram amplificados por reação de PCR, purificados e subclonados em vetor pPZP::BAR. Para ambas construções, a confirmação da disposição correta dos insertos foi obtida por clivagem enzimática (Figuras 4 e 5).

Figura 4. Modelo esquemático e confirmação das construções GFP::BAR em pPZP. Em azul está representada a região promotora putativa da trealase ácida de *Metarhizium anisopliae* isolada, em cinza a região de terminação TrpC, em verde a região codante da GFP, em roxo o gene marcador que confere resistência a glifosinato de amônio e em laranja o promotor constitutivo de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. No esquema são demonstrados os comprimentos de cada fragmento. Abaixo da nomenclatura de cada vetor gerado está seu tamanho em pb putativo. Em amarelo está representado vetor pPZP com 6.806 pb. Sítios para enzimas utilizados na confirmação estão representados no primeiro esquema. Acima está esquematizado as construções dos vetores, abaixo está demonstrada a confirmação por clivagem com o par enzimático *KpnI* e *EcoRI*. Marcador de DNA por tamanho em pb (DNA Ladder 1kb Plus) é representado como M. Círculos vermelhos mostram amostras positivas com tamanhos de bandas esperadas. Tamanho dos *cassettes* está representado à direita conforme legenda da figura.



Fonte: WEYH, 2014

Figura 5. Modelo esquemático e confirmação das construções yeCherry::BAR em pPZP. Em azul está representada a região promotora putativa da trealase ácida de *Metarhizium anisopliae* isolada, em cinza a região de terminação TrpC, em vermelho a região codante da yeCherry, em roxo o gene marcador que confere resistência a glifosinato de amônio e em laranja o promotor constitutivo de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. No esquema são demonstrados os comprimentos de cada fragmento. Abaixo da nomenclatura de cada vetor gerado está seu tamanho em pb putativo. Em amarelo, está representado vetor pPZP com 6.806 pb. Sítios para enzimas utilizados na confirmação estão representados no primeiro esquema. **A)** Acima estão esquematizadas as construções dos vetores e abaixo está demonstrada a confirmação por clivagem com o par enzimático *KpnI* e *EcoRI* para os fragmentos promotores de 1.540 e 500 pb. Círculos vermelhos mostram amostras positivas com tamanhos de bandas esperadas. Tamanho dos *cassettes* está representado à direita conforme legenda da figura. **B)** Gel da clivagem de confirmação da construção com o fragmento promotor com 750 pb de comprimento. Marcador de DNA por tamanho em pb (DNA Ladder 1kb Plus) é representado como M.



5.2 Agrotransformação de *M. anisopliae*

Os plasmídeos finais obtidos foram utilizados para transformar células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* (cada plasmídeo em um evento de transformação). Confirmadas, as células de *A. tumefaciens* contendo o vetor foram utilizadas em experimentos de agrotransformação de *M. anisopliae*.

Para cada agrotransformação foram isolados transformantes desenvolvidos em meio contendo glifosinato de amônio (Tabela 1). Estes possíveis transformantes passaram por triagem para confirmar a presença da inserção do *cassette* de interesse por PCR (Figura 6), utilizando-se os *primers* de amplificação da região codante da GFP ou yeCherry, e observação da fluorescência por microscopia. O número de transformantes isolados foi inicialmente superior a 100 por agrotransformação, onde observou-se que destes quase a totalidade (mais de 50 % do total de transformantes obtidos) apresentava confirmação quando passados por triagem da PCR (Figura 6), isso se deve ao fato de se tratar de uma recombinação ectópica no genoma, o que torna a eficiência de transformação maior quando comparada à recombinação homóloga, cuja eficiência mostrou ser de aproximadamente 2 % (STAATS, 2007).

Tabela 1 - Relação de isolados por agrotransformação.

Nome da Construção	Construção	Nº de isolados
TreaGB	pPZP::BAR::PTrea::GFP	163
Trea750GB	pPZP::BAR::PTrea750::GFP	50
Trea500GB	pPZP::BAR::PTrea500::GFP	50
Trea_yeCB	pPZP::BAR::PTrea::yeCherry	166
Trea750_yeCB	pPZP::BAR::PTrea750::yeCherry	50
Trea500_yeCB	pPZP::BAR::PTrea500::yeCherry	150
Total		629

Fonte: WEYH, 2014

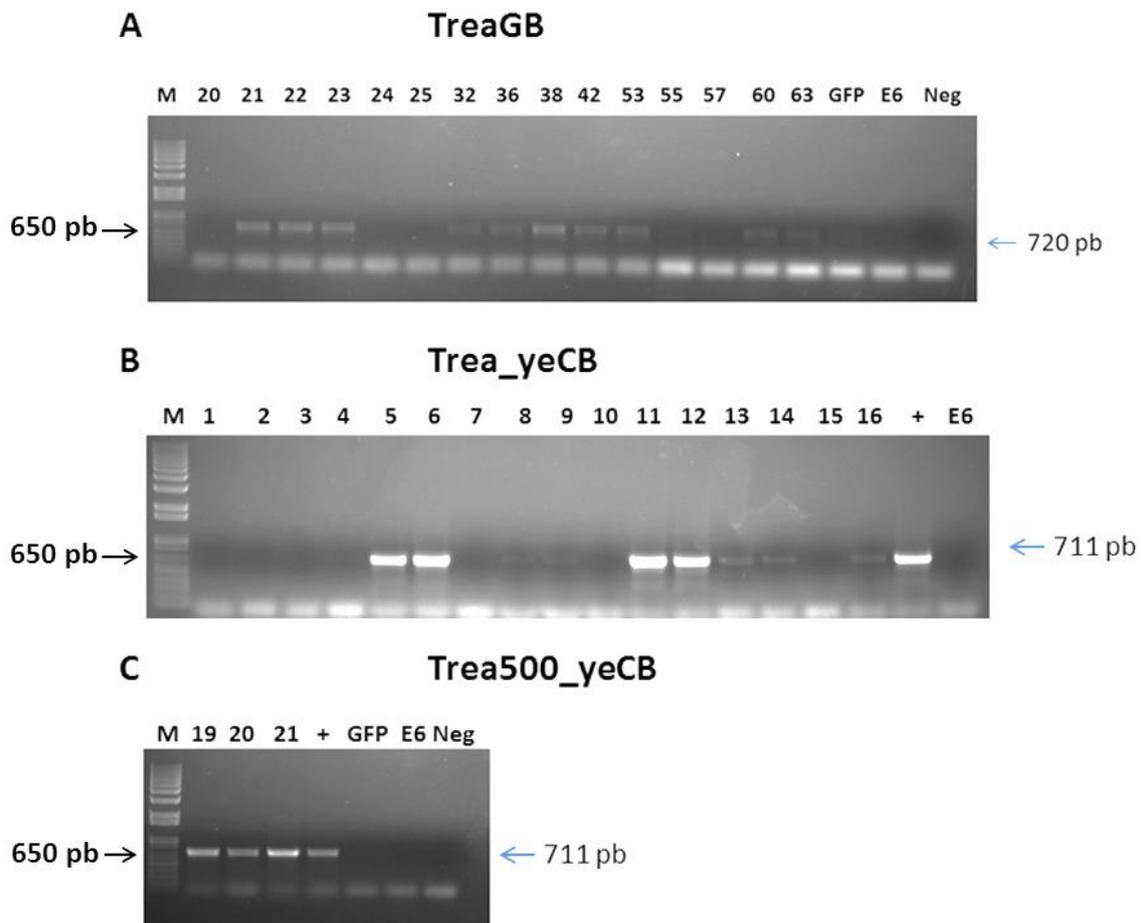
Inicialmente buscou-se isolar um grande número de possíveis transformantes, acima de 100, observadas para as primeiras agrotransformações (TreaGB, Treay_eCB e Treaa500_yeCB). Contudo, como obtivemos confirmações já nos vinte primeiros isolados

(Figura 6) optou-se por isolar 50 transformantes nas demais agrotransformações (Trea750GB, Trea500GB e Trea750_yeCB) (Tabela 1).

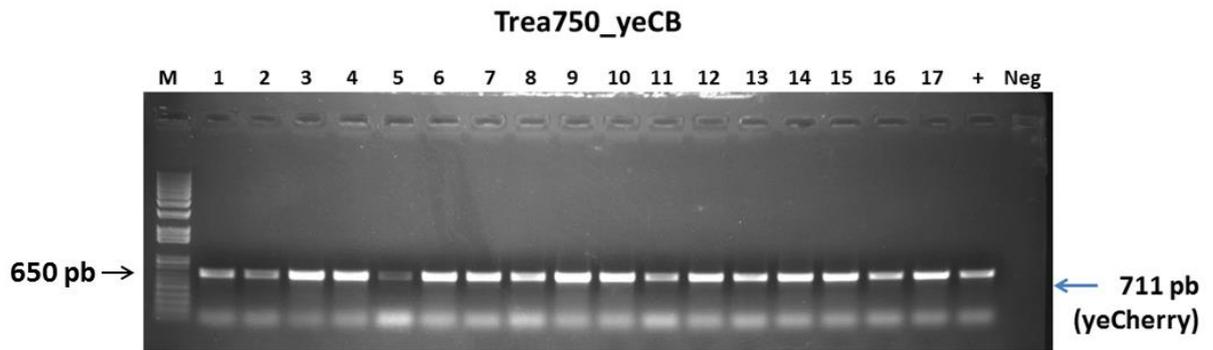
Os primeiros repiques mantinham a pressão de seleção com glifosinato de amônia. Porém, após confirmação da inserção no genoma, estes passavam a ser cultivados em MC sem glifosinato.

Nenhuma alteração morfológica foi observada até o momento e os transformantes são mantidos a 28°C.

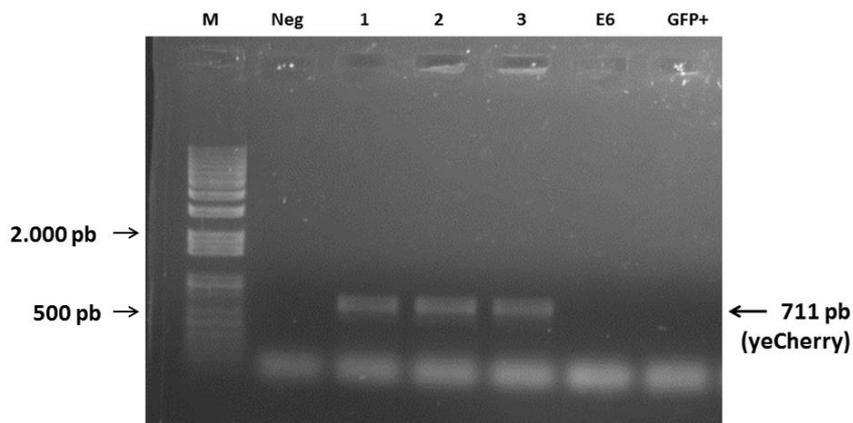
Figura 6. Triagem por PCR da presença do gene repórter nos potenciais transformantes. Foi utilizado como molde da PCR DNA extraído de esporos em micro-ondas dos transformantes e os *primers* para amplificação do gene repórter contido no vetor construído. Como controle positivo tem-se a linhagem E6_GFP+ e como controles negativos a linhagem E6 e ausência de amostra. Marcador de DNA por tamanho em pb (DNA Ladder 1kb Plus) é representado como M. **A)** PCR de amostras da agrotransformação do plasmídeo TreaGB - pPZP::BAR::PTrea::GFP. **B)** PCR de amostras da agrotransformação do plasmídeo Trea500_yeCB - pPZP::BAR::PTrea500::yeCherry. **C)** PCR de amostras da agrotransformação do plasmídeo Trea500_yeCB - pPZP::BAR::PTrea500::yeCherry. **D)** PCR de amostras da agrotransformação do plasmídeo Trea750_yeCB - pPZP::BAR::PTrea750::yeCherry. **E)** PCR de amostras das agrotransformações de todos os plasmídeos pPZP::BAR::yeCherry. 1, 2 e 3 representam respectivamente: pPZP::BAR::PTrea::yeCherry, pPZP::BAR::PTrea750::yeCherry e pPZP::BAR::PTrea500::yeCherry. GFP⁺ e E6 são utilizados como segundos controles negativos da reação da PCR para yeCherry. **F)** PCR de amostras das agrotransformações de todos os plasmídeos pPZP::BAR::GFP. 1, 2 e 3 representam respectivamente: pPZP::BAR::PTrea::GFP, pPZP::BAR::PTrea750::GFP e pPZP::BAR::PTrea500::GFP. E6 é utilizado como segundo controle negativo da reação da PCR para GFP. GFP⁺ é utilizado como controle positivo.



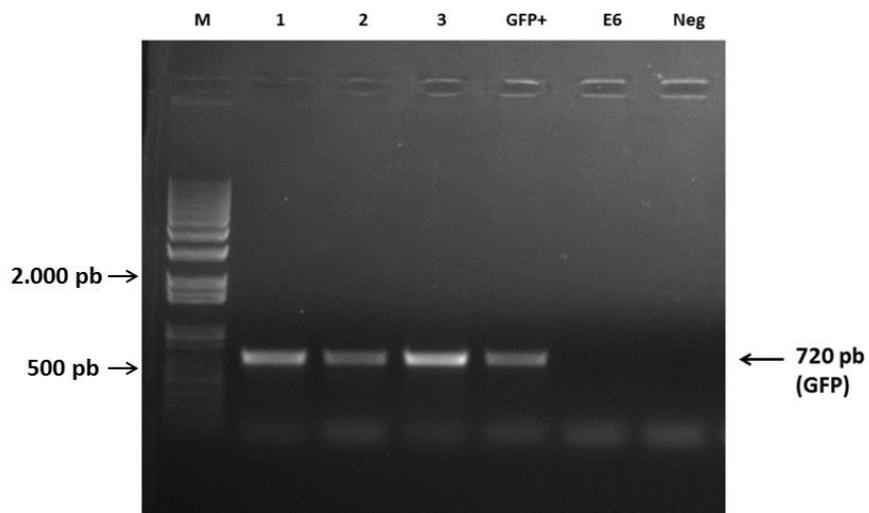
D



E



F



Fonte: WEYH, 2014

6. CONCLUSÕES

Este trabalho possibilitará uma melhor análise da região promotora do gene da trealase ácida do organismo modelo *Metarhizium anisopliae* através do isolamento de três diferentes

fragmentos da região, baseados em pré-análises computacionais, no intuito de observar a região mínima funcional.

Vetores de expressão tendo por genes repórter as proteínas fluorescentes GFP e yeCherry para cada fragmento promotor isolado foram obtidos com sucesso, servindo assim, de ferramentas de estudo tanto da região promotora como para futuros trabalhos, visto que, as sequências codantes podem ser substituídas por metodologia simples de clivagem.

Para cada molécula construída neste estudo, houve a obtenção de transformantes positivos do entomopatógeno por agrotransformação. A triagem realizada mostrou alta eficiência, conforme discutido anteriormente, possibilitando a utilização dos transformantes obtidos em estudos qualitativos e quantitativos da regulação do promotor aqui apresentado. Em testes preliminares, foi observada fluorescência em alguns dos transformantes o que parece confirmar a regulação do promotor dependente da fonte de carbono adicionada ao meio de cultivo (Figura 7). Porém, são necessárias observações mais precisas, conclusivas e ensaios de RT-PCR e RT-qPCR para confirmação da expressão regulada dos genes repórter.

Este trabalho mostra ser pioneiro e abre diversas oportunidades de pesquisas posteriores. Cabe ressaltar que mais estudos são necessários para um melhor entendimento do mecanismo de regulação pelo promotor, e que esta demonstra ser uma ferramenta útil para elucidar questões envolvendo genes, conhecidos ou não, possibilitando melhor controle por parte do pesquisador de forma fácil, prática e sem custo elevado.

Até a presente data nenhum vetor de expressão regulável foi descrito para *M. anisopliae*, logo, com esta ferramenta funcional novas perspectivas de melhoramento genético deste patógeno bem como um melhor entendimento do mesmo poderão ser mais rapidamente executados.

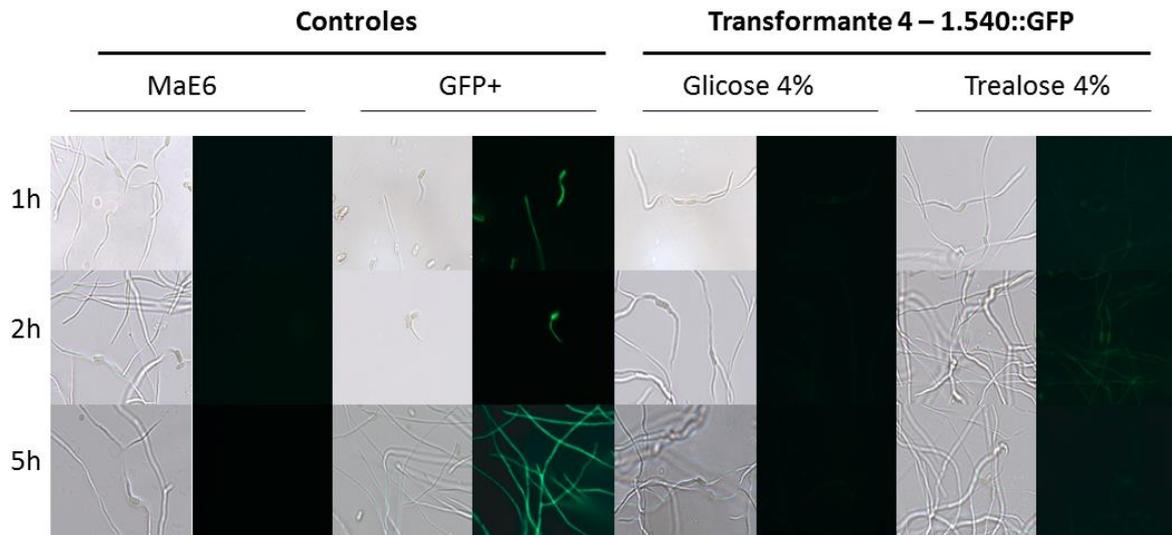


Figura 7. Observações preliminares de indução/repressão do entomopatógeno transformado com o *cassette* de expressão *TreaGB*. Foi realizado um inóculo de 10^5 esporos/ml em placa de Petri com lamínulas submersas em meio MC. Após 12h adicionou-se glicose 1% e após 24h de cultivo para os controles adicionou-se 1% de glicose, para o teste de repressão 4% de glicose e para teste de indução 4% de trealose. As lamínulas foram observadas após 1h, 2h e 5h pós indução/repressão. A figura mostra para todas as condições campo claro (esquerda) e campo escuro (direita). MaE6: linhagem selvagem (controle negativo). GFP+: linhagem de *M. anisopliae* contendo o gene repórter GFP sob regulação do promotor Tef. (controle positivo).

7. PERSPECTIVAS

Este trabalho ainda possui por perspectivas: i. Analisar os transformantes quanto à indução com trealose e repressão com glicose através da observação por ensaios de fluorescência; ii. Realizar ensaios de RT-qPCR na quantificação mais precisa da regulação dos diferentes fragmento promotores estudados, através dos genes repórter; iii. Realizar testes de bioensaio para verificação de possíveis alterações quanto a patogenicidade fúngica devido ao inserto, visto que, por se tratar de uma recombinação ectópica, pode ocorrer a interrupção de genes envolvidos no processo infectivo.

REFERÊNCIAS

- AQUINO, A.C. *et al.* Characterization of an acid trehalase produced by the thermotolerant fungus *Rhizopus microsporus* var. *Rhizopodiformis*: Biochemical properties and immunichemical localisation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, p. 169-175, 2005.
- ARRUDA, W., LUBECK, I., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. **Experimental and Applied Acarology** v. 37. p. 231-244, 2005.
- BOLDO, J.T. *et al.* Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. **Current Genetics**. v. 55. p.551-560, 2009.
- CAO, Y., JIAO, R., XIA, Y. A strong promoter, PMagpd, provides a tool for high gene expression in entomopathogenic fungus, *Metarhizium acridum*. **Biotechnology Letters**. v. 34. p.557-562, 2012.
- CLARKSON, J.M., CHARNLEY, A.K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology**. v.4. p.197-203, 1996.
- CROWE, J.H., CARPENTER, J.F., CROWE, L.M. The role of vitrification in anhydrobiosis. **Annual Review Physiology**. v.60. p.73-103, 1998
- DAENFERT, C., FONTAINE, T. Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* treA gene encoding an acid trehalase required for growth on trehalose. **Molecular Microbiology**. v.24. p.203-216, 1997.
- DESTRUELLE, M., HOLZER, H., KLIONSKY, D.J. Isolation and characterization of novel yeast gene, ATH1, which required for vacuolar acid trehalase activity. **Yeast**, v.11, p. 1015-1025, 1995.
- DUAN, Z. *et al.* A phosphoketolase Mpk1 of bacterial origin is adaptively required for full virulence in the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Environmental Microbiology**. v.11. p.2351-2360, 2009.
- ELBEIN, A. D. The metabolism of alpha, alpha-trehalose. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochememistry.**, v. 30, p. 227-256, 1974.
- ELBEIN, A.D., PAN, Y.T., PASTUSZAK, I., CARROLL, D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. **Glycobiology** vol. 13, p.17-27, 2003.
- FANG, W. *et al.* Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.102. p.155-159. 2009
- FELIX, C.R. Clonagem de um domínio desestabilizante em *Mycobacterium smegmatis* mc²155 para verificar o funcionamento de um método de regulação induzida de proteínas em micobactérias. Pelotas, 2010.
- FRANCHESCHINI, M. Envolvimento da protease PR1A na patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* e na infecção do carrapato bovino *Boophilus microplus*. Porto Alegre, 2005.

FRAZZON, A. P. *et al.* In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**. v.94. p.117-125, 2000.

GARÍ, E., PIEDRAFITA, L., ALDEA, M., HERRERO, E. A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**. v.13. p.837-848, 1997

GARRE, E. *et al.* Acid trehalase is involved in intracellular trehalose mobilization during postdiauxic growth and severe saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**. v.9. p.52-62, 2008

HE, M; XIA, Y. Construction and analysis of a normalized cDNA library from *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* germinating and differentiating on *Locusta migratoria* wings. **FEMS Microbiology Letters**. v.29. p.127-135, 2008

HE, S. *et al.* The *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar acid trehalase is targeted at the cell surface for its physiological function. **FEBS Journal**. v.276. p.5432-5446, 2009.

JORGE, J.A., POLIZELI, M.L.T.M., THEVELEIN, J.M., TERENCE, H.F. Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. **FEMS Microbiology Letters**. v.154. p.165-171, 1997.

JULES, M., BELTRAN, G., FRANÇOIS, J., PARROU, J.L. New insights into trehalose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: NTH2 encodes a functional cytosolic trehalase, and deletion of TPS1 reveals Ath1p-Dependent trehalose mobilization. **Applied and Environmental Microbiology**. v.74. p.605-614, 2008.

JUNGES, A. *Metarhizium anisopliae*: Expressão de proteína tóxica de origem vegetal e análise genômica de quitinases. Porto Alegre, 2010.

KAAYA, G.P., MUNYINYI, D.M. Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina spp.*) at developmental sites. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.66. p.237-241, 1995

LOPES, R.G. **Clonagem, expressão heteróloga e obtenção de mutantes da trealase ácida de *Candida glabrata***. Florianópolis, SC, 2010.

LUZ, C. *et al.* Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.93. p.839-846, 1998

NAKAZATO, L. *et al.* Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the tef-1 α homologous promoter. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.72. p.521-528, 2006

NWAKA, S., MECHLER, B., DESTRUELLE, M., HOLZER, H. Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**. v.360. p.286-290, 1995.

NWAKA, S., MECHLER, B., HOLZER, H. Deletion of the ATH1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. **FEBS Letters**. v.386. p.235-238, 1996.

PADILLA-GUERRERO, I.E. *et al.* Flexible metabolism in *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: role of the glyoxylate cycle during insect pathogenesis. **Microbiology**. v.157. p.199-208, 2010

PARROU, J.L., JULES, M., BELTRAN, G., FRANBOIS, J. Acid trehalase in yeasts and filamentous fungi: Localization, regulation and physiological function. **FEMS Yeast Research**. v.5. p.503-511, 2005.

ROBERTS, D.W., ST LEGER, R.J. *Metarhizium spp.*, cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. **Advances in Applied Microbiology**. v.54. p.1-70, 2004.

ROY, A. *et al.* Acid trehalase deficiency and extracellular trehalose utilization in *Candida utilis*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.17, p.737-729, 2001.

SAN MIGUEL, P.F., ARGÜELLES, J.C. Differential changes in the activity of cytosolic and vacuolar trehalases along the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.6. p.155-160, 1994

SANCHEZ-FRESNEDA, R. *et al.* On the biochemical classification of yeast trehalases: *Candida albicans* contains two enzymes with mixed features of neutral and acid trehalase activities. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 383, p. 98-102, 2009.

SCHOLTE, E.J., TAKKEN, W., KNOLS, B.G. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Acta Tropica**. v.102. p.151-158, 2007.

SILVA, W.O.B. *et al.* Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**. v.44. p.829-834, 2009.

ST. LEGER, R.J., COOPER, R.M., CHANRLEY, A.K. Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticle from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. **Journal of General Microbiology**. v.133. p.1371-1382, 1987.

ST LEGER, *et al.* Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 93. p. 6349-6354, 1996.

STAATS, C.C. **Estudo funcional de genes do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae***. Porto Alegre, 2007.

THEVELEIN, J.M. Regulation of trehalase activity by phosphorylation- dephosphorylation during developmental transitions in fungi. **Experimental Mycology**. v.12, p.1-12, 1988.

TOUNOU, A.K. *et al.* Interaction between *Paranosema locustae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*, two pathogens of the desert locust, *Schistocerca gregaria* under laboratory conditions. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.97. p.203-210, 2008

VEISOVA, D. *et al.* Role of individual phosphorylation sites for the 14-3-3-protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. **The Biochemical Journal**. v.1;443. p.663-670, 2012

WANG, C., ST LEGER, R.J. 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**, v.6. p.808-816, 2007.

WESSELS, J.G.H. Hydrophobins, unique fungal proteins. **Mycologist**. v.14. p.153-159, 2000.

XIA, Y. *et al.* Molecular cloning, characterisation, and expression of a neutral trehalase from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 80. p.127-132, 2002.

XIA, Y., CLARKSON, J.M., CHARNLEY, A.K. Trehalose hydrolysing enzymes of *Metarhizium anisopliae* and their role in pathogenesis of the tobacco hornworm, *Manduca Sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.80. p.139-147, 2002.

ZHANG, C., XIA, Y. Identification of genes differentially expressed in vivo by *Metarhizium anisopliae* in the hemolymph of *Locusta migratoria* using suppression-subtractive hybridization. **Current Genetics** v.55. p.399-407, 2009.

ZHAO, H., *et al.* Identification of an Extracellular Acid Trehalase and Its Gene Involved in Fungal Pathogenesis of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Biochemistry**. v.140. p.319-327, 2006.