

Isolamento e Caracterização da Região Promotora do Gene da Trealase Ácida de *Metarhizium anisopliae* para o Desenvolvimento de Vetores Reguláveis.

Aline Weyh^{1,2}, Ângela Junges², Charley Christian Staats², Juliano Tomazzoni Boldo¹ e Augusto Schrank¹

¹Universidade Federal do Pampa – Centro Interdisciplinar de Pesquisa em Biotecnologia – CIPBiotec

Av. Antônio Trilha, 1817 - São Gabriel – RS – CEP:97300-000

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos - Centro de Biotecnologia – CBiot/UFRGS

Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédios 43421/43431 - Setor IV - Campus do Vale - CxP. 15005 – CEP:91501-970 - Porto Alegre – RS

E-mail para contato: alineweyh.aw@gmail.com

RESUMO

Metarhizium anisopliae é um fungo entomopatogênico biocontrolador de amplo espectro. Na etapa infectiva em que atinge a hemolinfa do hospedeiro, a principal fonte nutricional encontrada é a trealose. Para utilizá-la o fungo, secreta uma trealase ácida. Esta enzima (EC. 3.2.1.28) cliva o dissacarídeo em subunidades de glicose. Existem poucos relatos sobre os elementos de regulação no promotor deste gene, mas sugere-se que deve haver elementos de repressão catabólica por glicose e elementos responsivos a trealose. Com base nisso, nosso objetivo é caracterizar a região promotora do gene trealase ácida de *M. anisopliae*. Para isso, as proteínas repórter GFP e yeCherry foram fusionadas a jusante de três fragmentos promotores de diferentes tamanhos, a fim de se obter a menor região funcional promotora. O isolamento deste promotor funcional será utilizado na construção de vetores para a expressão induzível de genes alvo.

Palavras-chave: Promotor, Trealase Ácida, GFP, yeCherry, Vetor, Regulação.

INTRODUÇÃO

M. anisopliae é considerado modelo de estudo das interações patógeno-hospedeiro e é amplamente utilizado como agente biocontrolador de pragas.¹ Este fungo apresenta fatores de virulência na etapa infectiva, dentre os quais estão inúmeras hidrolases secretadas. Quando em infecção de hospedeiro suscetível, 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.^{2,3}

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.⁴

Há poucos estudos relativos a região promotora do gene da trealase ácida de *M. anisopliae*. Sugere-se que deve haver elementos de repressão catabólica por glicose bem como elementos responsivos a trealose.^{2,5} Com base nos dados apresentados até o presente momento, este trabalho objetivou caracterizar a região promotora do gene da trealase ácida de *M. anisopliae*, através da utilização de proteínas fluorescentes

fusionadas a diferentes tamanhos deste promotor para permitir a sua utilização na elaboração de vetores reguláveis por fonte de carbono.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos e condições de crescimento: A linhagem E6 do fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae*, utilizada neste trabalho, foi mantida em Meio de Cove completo (MCc) sólido à 28°C até completa esporulação. A suspensão de esporos foi obtida por coleta dos esporos das placas com solução tween 0,001% e 1×10^6 esporos/mL foram inoculados em MCc líquido a fim de obter micélio e proceder com extração de DNA. A extração de DNA foi realizada com tampão de lise e método de fenol/clorofórmio conforme descrito anteriormente.⁶ Para os experimentos de clonagem utilizou-se *E. coli* linhagem TG2 e linhagem DH5 α mantidas em LB sólido a 37°C.

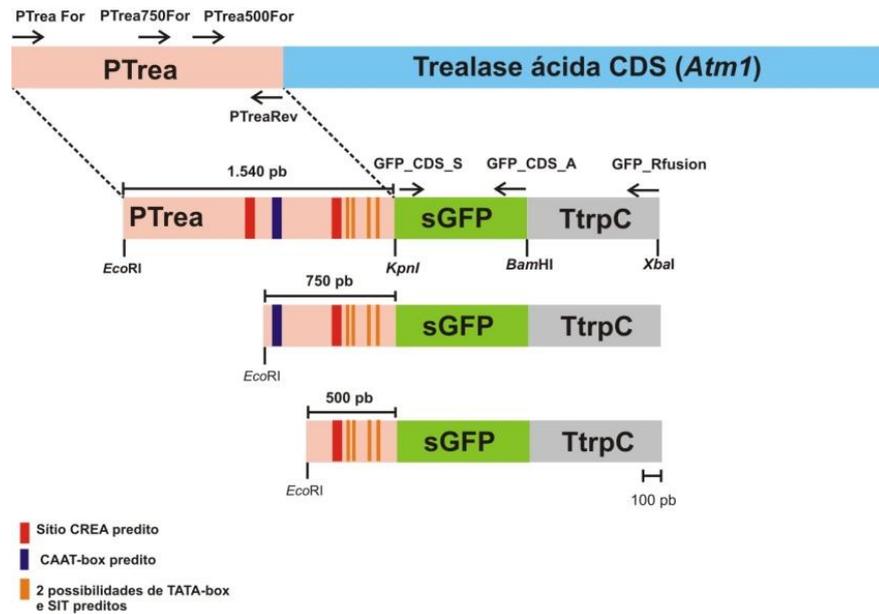
Isolamento da região promotora: Após crescimento do fungo em meio MCc líquido o DNA fúngico foi extraído a partir do micélio e utilizado como molde para o isolamento da região de interesse em uma reação de PCR. Para isolar diferentes fragmentos da região promotora putativa do gene da trealase ácida, três *primers* diretos e um reverso foram desenhados. Para fins de uso posterior em clonagem, estes *primers* possuem sítios para as enzimas de restrição *KpnI* e *EcoRI* em suas extremidades (sublinhado). As reações de PCR foram realizadas utilizando Taq DNA polimerase de alta afinidade (Invitrogen). Optou-se por isolar três tamanhos de fragmentos promotores, objetivando identificar a menor sequência promotora responsável pela expressão do gene, com tamanhos de 1.540 pb, 750 pb e 500 pb. Para a região de 1.540 pb utilizou-se o primer forward PTreaFor 5' GAATTCTGCGCCATACCGAGAGCTGC 3', para o fragmento de 750 pb o primer utilizado foi PTrea750For 5' GAATTCCGGTTGGCGATAAGAGA 3' e para a amplificação da região de 500 pb usou-se o primer PTrea500For 5' GAATTCCCAGCACAGCTTGTTGAG 3'. Para as três reações de amplificação o primer reverso foi o PTreaRev 5' GGTACCGTTGCGAGTCCCGGGCTCGA 3'. Estes primers amplificam uma sequência a montante da região codificante da trealase ácida (*Atm1*) conforme esquematizado.^{fig.1}

Figura 1. Representação esquemática da região promotora putativa da trealase ácida de *Metarhizium anisopliae* e a estratégia para sua caracterização.



SIMBBTEC
Londrina 2013

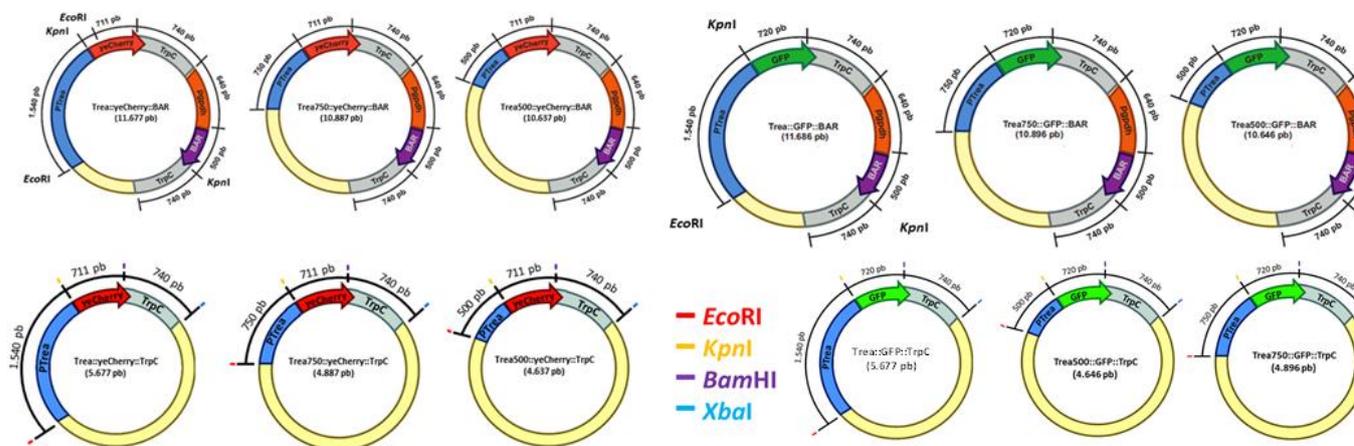
Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia Trabalho Completo apresentado na seção: POSTER



Construção dos cassetes: Neste estudo, optou-se por manter como genes repórter dos constructos a região codificante da proteína fluorescente verde (GFP) e da proteína vermelha fluorescente (yeCherry), esta última devido à sua melhor estabilidade. Todos vetores foram construídos por sucessivas subclonagens de fragmentos isolados por clivagens ou *amplicons* de PCR. Os vetores elaborados e sítios enzimáticos utilizados são demonstrados no esquema abaixo. ^{fig 2}

O vetor pPZP::BAR utilizado contém a sequência responsável por conferir resistência a herbicidas que apresentam princípio ativo ao glufosinato de amônio e codifica uma fosfinotricina acetiltransferase (PAT), servindo de marcador de seleção de transformantes. A agrotransformação de *M. anisopliae*, foi realizada segundo protocolo estabelecido no laboratório anteriormente.⁷ A triagem dos transformantes está sendo feita por PCR com *primers* que amplificam o gene repórter, e por observação da fluorescência por microscopia.

Figura 2. Diagrama esquemático da elaboração dos vetores contendo diferentes tamanhos para o promotor da trealase ácida (azul) fusionados a GFP (verde) ou yeCherry (vermelho).





RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtidos os fragmentos promotores por PCR, 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.

O gene repórter yeCherry foi amplificado por PCR e posteriormente subclonado substituindo GFP através de clivagem com as enzimas *KpnI* e *BamHI*.

Após confirmação, dos *cassettes* contendo GFP em pUC18 estes foram removidos clivando com as enzimas contidas nas extremidades *EcoRI* e *XbaI*, purificados e subclonados no vetor binário, de resistência a glifosinato de amônio, pPZP::BAR. Depois da 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.

Os plasmídeos pPZP::BAR::PTrea::GFP e pPZP::BAR::PTrea::yeCherry contendo três diferentes tamanhos de promotor foram utilizados para transformar células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*. Obtidas as confirmações, as células de *A. tumefaciens* contendo os vetores acima descritos estão sendo utilizados em experimentos de agrotransformação de *M. anisopliae*.

Obteve-se transformantes desenvolvidos em meio contendo glifosinato de amônio, estes possíveis transformantes estão sendo analisados para confirmar a presença da inserção do *cassette* de interesse por PCR, utilizando-se os *primers* que amplificam a região codante do gene repórter GFP ou yeCherry, além da observação da fluorescência por microscopia em meio com indução por trealose.

CONCLUSÕES

Foram construídos seis vetores contendo a região promotora do gene da trealase ácida fusionados a GFP ou yeCherry, os quais estão sendo utilizados para transformar *M. anisopliae* utilizando *A. tumefaciens*. Este trabalho ainda tem por perspectivas: (I) realizar a agrotransformação para o plasmídeo pPZP::BAR::PTrea750::yeCherry; (II) analisar a fluorescência de GFP e yeCherry em cultivos com os fungos transformados em meio indutor com trealose e repressor com glicose por microscopia; (III) realizar estudos de bioensaios.

REFERÊNCIAS

- (1) HE, M; XIA, Y. Construction and analysis of a normalized cDNA library from *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* germinating and differentiating on *Locusta migratoria* wings. *FEMS Microbiology Letters*. V. 291, n. 1, p. 127-135, 2009.
- (2) ZHAO, H.; CHARNLEY, A.K.; WANG, Z.; YIN, Y.; LI, Z.; LI, Y.; CAO, Y.; PENG, G.; XIA, Y. 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.
- (3) 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, n. 2, p. 127-137, 2002.
- (4) ELBEIN, A. D. The metabolism of alpha, alpha-trehalose. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. v. 30, p. 227-256, 1974.



III SIMBBTEC
Londrina 2013

Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia
Trabalho Completo apresentado na seção: POSTER

(5) NWAKA, S.; MECHLER, B.; DESTUELLE, M.; HOLZER, H.

Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*.

FEBS Letters. V. 360, p. 286-290, 1995.

(6) NAKAZATO L; DUTRA V; BROETTO L; STAATS CC; VAINSTEIN MH; SCHRANK A. Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef-1alpha* homologous promoter. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 72, n. 3, p. 521-528, 2006.

(7) STAATS, C. C. **Estudo funcional de genes do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae***. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2007.