

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

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE
CODIFICA A PROTEÍNA gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
DO FUNGO *Metarhizium anisopliae***

Dissertação de Mestrado

Leonardo Broetto

Porto Alegre, 2006.

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

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE
CODIFICA A PROTEÍNA gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
DO FUNGO *Metarhizium anisopliae***

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

Leonardo Broetto

Orientador: Augusto Schrank

Co-orientador: Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, 2006.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul. O projeto foi financiado com recursos da CAPES, CNPq, Fapergs e PROCAD.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Augusto Schrank pela orientação e auxílio prestados no decorrer deste trabalho, mas, sobretudo pela oportunidade e confiança depositados em mim.

À Professora Marilene Henning Vainstein pela orientação e auxílio e, da mesma forma, pela oportunidade e confiança.

À Professora Irene Silveira Schrank por toda a orientação e ajuda durante o período de trabalho no Projeto Genoma Funcional de *Chromobacterium violaceum*, que foi de grande importância para minha formação e currículo. E também pela correção e ajuda prestados na elaboração desta dissertação.

Aos Professores Henrique Bunselmeyer Ferreira e Arnaldo Zaha membros da comissão de acompanhamento.

À Professora Célia Maria de Almeida Soares pela orientação no período do meu estágio na Universidade Federal de Goiás e pelo apoio irrestrito que me foi dado por ela neste. Deixo também meus agradecimentos a toda equipe do LBM da UFG, que me receberam e me auxiliaram de uma maneira fora do comum.

A todos colegas do Centro de Biotecnologia, mas principalmente aos dos laboratórios 217, 220 e 222.

À Valéria e ao Luciano que tiveram grande importância na minha formação durante o período de Iniciação Científica.

Ao Professor J. R. Martins do Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor pelos carrapatos (*Boophilus microplus*) cedidos para realização desse trabalho.

À Professora Célia Carlini pelos insetos (*Dysdercus peruvianus*) cedidos para realização desse trabalho.

À REDE PIGS, laboratório coordenado pelo Prof. Arnaldo Zaha, pelo sequenciamento de DNA utilizado neste trabalho.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia.

A minha família: meus pais e meu irmão.

E a todos que de uma maneira ou de outra contribuíram para realização desse trabalho.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	VII
1. Introdução	1
2. Revisão da literatura	1
2.1. A enzima multifuncional gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	2
2.2. Os genes <i>gpdh</i> em fungos	8
2.3. Modelo de estudo: o biocontrolador <i>Metarhizium anisopliae</i>	10
3. Objetivos	
3.1. Objetivo geral	11
3.2. Objetivos específicos	11
4. Manuscrito “<i>Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of Metarhizium anisopliae</i>”	12
5. Discussão	33
6. Conclusões	38
7. Perspectivas	39
8. Referências	40

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
A	Ácido adenílico
ATP	Adenosina trifosfato
C	Ácido citidílico
cDNA	Seqüência de DNA complementar
cm	Centímetro
CREA	Proteína reguladora envolvida na repressão catabólica de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleosídeo trifosfato
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
G	Ácido guanidílico
GAPDH	Proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<i>gpdh</i>	Gene para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFP	<i>“Green fluorescent protein”</i>
GOX	Glicose-oxidase
h	Hora
HSE	<i>“heat shock element”</i>
HSF	<i>“heat-stress transcription factor”</i>
Kb	quilo base
kDa	Quilodaltons
L	Litro
M	Molar
MC	Meio de Cove
MCc	Meio de Cove completo
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NAD	Dinucleotídeo adenina-nicotinamida
ng	Nanograma
nt	Nucleotídeos
nm	Nanômetro
ORF	Fase de leitura aberta
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da DNA-polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico

qRT-PCR	RT-PCR quantitativo
RDA	Análise de diferença representacional
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
RNase	Ribonuclease
RNA poli A ⁺	RNA poliadenilado
rRNA	RNA ribossômico
RT-PCR	Reação em cadeia da DNA-polimerase com transcrição reversa

s	Segundos
SDS	Dodecilsulfato de sódio
T	Ácido timidílico
<i>tef1-α</i>	Gene para o fator de alongamento da tradução 1- α
U	Unidade de atividade enzimática
v/v	Volume por volume
w/v	Peso por volume

1. INTRODUÇÃO

O isolamento e a caracterização, em diversas espécies de diferentes gêneros de fungos, do gene que codifica para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), tem sido alvo de muitos estudos (Holland e Holland, 1979; Punt *et al.*, 1992). O objetivo é, em geral, utilizar a região do promotor deste gene como elemento capaz de fornecer forte sinal para o início da transcrição visando à expressão de proteínas homólogas e heterólogas (Alves *et al.*, 2004; Kuo *et al.*, 2004; Pachlinger *et al.*, 2005).

A escolha deste gene está baseada na premissa de que este teria “expressão constitutiva”. Entretanto, tem se demonstrado a sua regulação em nível transcricional. Além disso, a proteína GAPDH, primariamente descrita como tendo atividade enzimática na via glicolítica, tem sido relacionada a outras funções não-glicolíticas e apresentando localizações celulares outras que não a citosólica, nos mais diversos organismos (Sirover, 1999a). A descoberta destas funções “alternativas” de GAPDH tem atraído grande interesse na literatura (Kim e Dang, 2005b). Em especial, a possibilidade de esta proteína participar de processos envolvidos na patogenicidade de fungos tem sido sugerida (Barbosa *et al.*, 2006b).

Aplicando uma estratégia global para isolar seqüências potencialmente envolvidas no processo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae*, Dutra, *et al.* (2004) isolaram uma seqüência que foi caracterizada como codificadora de GAPDH. Possíveis alterações no padrão de expressão desse gene poderiam levar a pressupor que também em *M. anisopliae* a enzima GAPDH possa ter função importante na capacidade do fungo em adaptar-se a algumas condições metabolicamente desfavoráveis, assim como ter alguma função no processo de infecção no hospedeiro artrópode.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Devido a alguma confusão na nomenclatura utilizada na literatura para os genes da enzima GAPDH (EC 1.2.1.12) e da enzima glicerol-3-fosfato

desidrogenase (GPD, EC 1.1.1.8), irei me referir, neste trabalho, ao gene codificando GAPDH em *M. anisopliae* pela abreviatura de gene *gpdh1*.

2.1. A enzima multifuncional gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, EC 1.2.1.12), é essencial na via da glicólise e da gliconeogênese, catalisando a Fosforilação Oxidativa do substrato gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato na presença de NAD^+ e fosfato inorgânico. Esta mesma enzima é também capaz de catalisar a reação inversa (Figura 1). A enzima é um homotetrâmero, sendo que cada um dos monômeros possui uma massa molecular de 36 kDa. GAPDH é especial entre as enzimas glicolíticas devido a sua capacidade de ligar-se aos cofatores NAD^+ e NADH, assim como de ligar-se a DNA e RNA. Estudos recentes demonstram funções não-glicolíticas inesperadas para a enzima GAPDH em processos fisiológicos e patológicos. Também em alguns patógenos, tais como *Candida albicans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, a enzima GAPDH tem sido encontrada na parede celular onde poderia desempenhar diversas funções na interação patógeno-hospedeiro.

O gene *gpd1*, (GAPDH de *Mucor circinelloides*), foi analisado em termos de seu padrão transcricional sob diferentes condições de cultivo em experimentos de *Northern blot*. *M. circinelloides* foi cultivado aerobicamente em meios contendo diferentes fontes de carbono. Em presença de glicose, uma forte expressão de *gpd1* foi observada enquanto uma baixa expressão foi observada quando glicerol ou etanol foram adicionados ao meio de cultura, ao invés de glicose. Esses resultados mostram que a expressão do gene *gpd1* é inicialmente regulada em resposta à fonte de carbono (Wolff e Arnau, 2002).



Figura 1. A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (EC 1.2.1.12). (A) Reação catalisada pela enzima GAPDH. (B) GAPDH inserida na glicólise, que pode ser dividida em três estágios: (1) desestabilização da molécula de glicose; (2) duas moléculas interconvertíveis de três carbonos são geradas pela clivagem de uma molécula de seis carbonos de frutose e (3) ATP é gerado.

Em um trabalho mais recente desse mesmo grupo, uma análise da região promotora do gene *gpd1* foi realizada a partir de experimentos de deleção de seqüências desta região e também por fusão com o gene GOX (codifica a enzima glicose oxidase 1), de *Aspergillus niger* como proteína repórter. Linhagens de *Mucor* contendo o cassete, constituído do promotor de *gpd1* de 741 pb (ou parte dele) dirigindo a transcrição do gene GOX, integrado nos seus genomas foram construídas e usadas no estudo da regulação da expressão em resposta a diferentes fontes de carbono no meio de cultura. Com os dados obtidos dessa análise um modelo de regulação do promotor *gpd1* foi elaborado, sugerindo o envolvimento de seqüências regulatórias identificadas - quatro repetições CATCAC sem homologia a nenhum sinal regulatório e quatorze elementos responsivos a choque-térmico (“*heat shock element*” HSE) – e as medidas de atividade de GOX em cada linhagem transformante (Larsen *et al.*, 2004).

O modelo proposto assume que as diferenças observadas no nível de atividade da enzima repórter GOX, entre as diferentes linhagens utilizadas, seriam devido à funcionalidade do promotora de *gpd1*. Mais especificamente, os autores observaram que a indução por fonte de carbono e o efeito das concentrações de açúcares (glicose 5% e 0,5%; glicerol 1%; etanol 0,4% e gluconolactona 20mM) foram perdidas na linhagem transformante derivada do fragmento de 361 pb de um total de 741 pb da região promotora. Desde que a porção ausente compreende três das quatro repetições CATCAC, é concebível especular que essas repetições estariam envolvidas em um possível mecanismo regulatório. O modelo mais simples explicando os resultados encontrados inclui um regulador negativo que poderia se ligar às repetições CATCAC em condições de baixa concentração de monossacarídeos, reduzindo assim o nível de expressão. Um aumento na concentração de glicose resultaria na liberação do regulador negativo e em um aumento no nível de expressão. Ainda, um regulador positivo análogo ao fator de transcrição responsivo a choque-térmico (“*heat-stress transcription factor*”, HSF), poderia se ligar cooperativamente aos tripletos de HSE, resultando na indução da expressão do gene *gpd1* (Figura 2), sugerindo que a expressão do gene *gpd1* de *M. circinelloides* poderia ser regulada por estresse térmico (Larsen *et al.*, 2004).

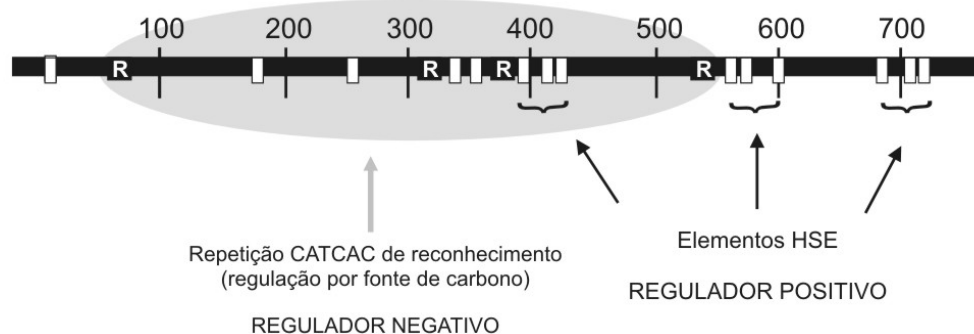


Figura 2. Modelo de regulação do promotor de *gpd1* de *M. circinelloides* (modificado de Larsen *et al.*, 2004). Este modelo propõe dois mecanismos principais envolvidos na regulação do gene *gpd1*: (i) a indução por glicose e (ii) a regulação por estresse. Na regulação por glicose, o modelo propõe o envolvimento de quatro repetições CATCAC presentes na região promotora (marcadas com “R”) envolvidas no reconhecimento por um regulador negativo. Quando o fungo está em meio com baixa concentração de glicose, um regulador negativo (elipse cinza) se ligaria ou interagiria com o promotor, diminuindo a transcrição do gene. Em alta concentração de glicose, o regulador negativo seria liberado, permitindo a transcrição. Na regulação por estresse, um regulador positivo análogo a HSF se ligaria aos HSE, resultando na indução da transcrição de *gpd1*.

Em um trabalho previamente publicado pelo nosso grupo foi utilizada uma metodologia de análise de diferença representacional (“*Representational Difference Analysis*”, RDA; Dutra *et al.*, 2004) para isolar seqüências de genes que apresentam expressão diferencial em *M. anisopliae*. Foram comparadas as populações de mRNA de duas condições de cultivo: (i) cultivo em meio rico, onde, em princípio, os genes envolvidos no processo de infecção de hospedeiros teriam a sua expressão diminuída e (ii) cultivo em presença de cutícula de hospedeiro (carrapato) como única fonte de energia, mimetizando a condição de infecção, onde os genes potencialmente envolvidos no processo de infecção teriam a sua expressão aumentada. Entre as seqüências selecionadas foi encontrada uma seqüência relacionada a GAPDH (gene *gpdh*

de *M. anisopliae*). Em ensaios de “Northern blot” foi mostrado que esta seqüência isolada apresentava níveis aumentados de transcritos em culturas de *M. anisopliae* na presença de cutícula. A partir desta seqüência original o gene *gpdh1* foi isolado e caracterizado. Este padrão de regulação positiva poderia suscitar um possível envolvimento de GAPDH durante a infecção por *Metarhizium anisopliae* no hospedeiro, como por exemplo, na adesão do esporo no exoesqueleto do animal.

Trabalhos recentes investigando o fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis* demonstraram fortes evidências de envolvimento da enzima GAPDH na adesão e na internalização da célula fúngica no hospedeiro. *P. brasiliensis* é um fungo dimórfico, agente causador da paracoccidioidomicose. Neste fungo foi observado um aumento nos níveis de transcritos do gene codificando GAPDH, assim como um aumento no nível da enzima na forma leveduriforme, a forma parasítica, em detrimento de uma diminuição nos níveis protéico e transcricional na forma micelial (Barbosa *et al.*, 2004). Posteriormente o grupo investigou o motivo da regulação de GAPDH e de sua provável função na forma parasítica de *P. brasiliensis*, e pela primeira vez a presença de GAPDH foi detectada interagindo com a parede celular do fungo por imunomicroscopia eletrônica. Foi demonstrada a afinidade de GAPDH à componentes da matriz extracelular, tais como laminina, fibronectina e colágeno tipo I. Além disso, foi demonstrada uma inibição significativa da adesão e da infecção das células epiteliais pelo fungo *P. brasiliensis* quando pneumócitos e células leveduriformes de *P. brasiliensis* eram tratados com GAPDH recombinante do fungo ou com anti-soro policlonal anti-GAPDH, respectivamente (Barbosa *et al.*, 2006). Os autores sugerem com este estudo que GAPDH de *P. brasiliensis*, além da função na via glicolítica, teria localização na superfície do fungo e desempenharia uma função na adesão à pneumócitos.

Outra função não glicolítica de GAPDH é a de atuar como um regulador transcricional sendo demonstrada em células de mamíferos (Zheng *et al.*, 2003). Neste caso a proteína é um dos componentes do complexo co-ativador OCA-S (“Oct-1 CoActivator in S phase” ou co-ativador de Oct-1 na fase S) que é um transativador fase-S dependente do gene da histona H2B . A dependência estrita da subunidade GAPDH do complexo OCA-S para a

transcrição da histona H2B foi claramente estabelecida por estudos funcionais envolvendo a depleção celular mediada por RNAi e imunodepleção, seguida por complementação com GAPDH purificada, em extratos nucleares. Foi demonstrado que, neste sistema, GAPDH é funcional *in vitro*, é específica da fase-S e está associada especificamente com o promotor de H2B *in vivo*. Outro indicativo do seu papel essencial na função de co-ativador de OCA-S é o fato de GAPDH interagir diretamente com o fator Oct-1, fornecendo assim o principal “ancoramento” para o complexo OCA-S conectar-se à Oct-1 ligado ao promotor. Entretanto, a conclusão mais interessante desse trabalho parece ser a de que a atividade de OCA-S é modulada pela razão celular entre $\text{NAD}^+:\text{NADH}$, assim como modula a interação do fator de transcrição Oct-1 com GAPDH. Quando esta razão é baixa, a atividade de OCA-S aumenta. A ligação do complexo OCA-S ao promotor de H2B é aumentada por NAD^+ , mas inibida por NADH. Assim GAPDH teria a função de integrar o metabolismo energético e a regulação do ciclo celular por coordenar a transcrição da histona H2B (Zheng et al., 2003a).

Apesar da aparente distância evolutiva entre os sistemas celulares de mamíferos e de fungos, a interação entre GAPDH e componentes da maquinaria de transcrição foi descrita também em *Schizosaccharomyces pombe* (Mitsuzawa et al., 2005). Experimentos utilizando a técnica de duplo-híbrido revelaram que GAPDH interage com a subunidade Rpb7 da RNA-polimerase II. Além disso, GAPDH pode ligar-se às proteínas recombinantes Rb4/Rb7. Esse resultado sugere que Rb7 media a associação de GAPDH com o complexo polimerase II. Assim, em *S. pombe*, GAPDH poderia mediar a ativação transcricional em resposta ao estado metabólico da célula ou em resposta à estresse oxidativo, através da interação com a holo-enzima polimerase II.

Apesar do uso tradicional do gene codificando GAPDH como controle interno para experimentos com a finalidade de analisar o padrão transcricional celular, um crescente número de trabalhos recentes vem desaconselhando o uso deste gene com esse fim, e cada vez mais o termo “*housekeeping genes*” (genes de manutenção celular) tem sido usado com cautela. Métodos comuns de quantificação de mRNA incluem “*Northern blotting*”, ensaio de proteção à RNase, “*microarray*”, e qRT-PCR. Independente da metodologia utilizada, a

normalização usando genes que não apresentam variação nos níveis de transcritos é necessária para corrigir a concentração de mRNA total em amostras sob comparação. Embora seja normalmente assumido que a expressão de genes “*housekeeping*” se mantém constante, ela pode realmente variar consideravelmente entre diferentes estágios do desenvolvimento celular e, desta forma, levar a interpretações errôneas do perfil de expressão de um determinado gene alvo (Yan e Liou, 2006).

2.2. Os genes *gpdh* em fungos

Os genes *gpdh* possuem alta conservação entre os fungos, assim como na grande maioria dos seres vivos. Entretanto, existem algumas diferenças interessantes nestes genes entre os táxons dentro do reino Fungi, principalmente entre os grupos mais distantes evolutivamente, como fungos leveduriformes e fungos filamentosos. Algumas dessas diferenças dizem respeito ao número de cópias do gene no genoma dos microrganismos, a distribuição de íntrons e a outras atividades da proteína além da glicolítica convencional (Tabela 1).

Tabela 1. Os genes *gpdh* em fungos.

	Fungo	Genes <i>gpdh</i>	Íntrons	Outras funções da proteína/localizações	Referência
Leveduriformes	<i>Cryptococcus neoformans</i> (Basidiomycota)	<i>GPD</i>	11	Não há relato.	(Varma e Kwon-Chung, 1999)
	<i>Kluyveromyces lactis</i> (Ascomycota)	<i>GDP1</i>	(-)	Aceptora de NADP.	(Verho <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (Ascomycota)	<i>GAP1</i> , <i>GAP2</i> e <i>GAP3</i>	(-)	Floculação.	(Almeida <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Ascomycota)	<i>tdh1</i> , <i>tdh2</i> e <i>tdh3</i>	(-)	Associação à parede celular ^a .	(Delgado <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (Ascomycota)	<i>Gpd1</i> e <i>Gpd3</i>	(-)	Associação com RNAP II	(Mitsuzawa <i>et al.</i> , 2005)
Filamentosos	<i>Aspergillus nidulans</i> (Ascomycota)	<i>gpdA</i>	6	Ritmo circadiano.	(Greene <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Neurospora crassa</i> (Ascomycota)	<i>gpd-1</i> e <i>ccg-7</i>	2	Ritmo circadiano.	(Shinohara <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Trichoderma harzianum</i> (Ascomycota)	<i>gpd</i>	(-)	Conidiação e micoparasitismo.	(Puyesky <i>et al.</i> , 1997)
Dimórficos	<i>Candida albicans</i> (Ascomycota)	<i>TDH1</i>	(-)	Associação à parede celular e ligação à fibronectina e laminina.	(Gil-Navarro <i>et al.</i> , 1997; Gozalbo <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Mucor circinelloides</i> (Zygomycota)	<i>gpd1</i> , <i>gpd2</i> e <i>gpd3</i>	2, 3 e 2	Responsivo à diferentes fontes de carbono.	(Larsen <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Ascomycota)	<i>Pbgapdh</i>	4	Associação à parede celular e adesão à matriz extracelular.	(Barbosa <i>et al.</i> , 2004)

(-) Não há interrupção por íntron.

^a A análise por “Western blot” de extratos da parede celular assim como do citosol revelaram que as proteínas TDH2 e 3 estão presentes em ambas localizações durante a desenvolvimento celular exponencial, enquanto que TDH1, também está presente em ambas localizações, mas foi detectado apenas em fase estacionária. Assim, se sugere (no entanto sem confirmação) que TDH1 poderia estar envolvida em outro processo que não a glicólise.

2.3. Modelo de estudo: o bio-controlador *Metarhizium anisopliae*

O fungo *Metarhizium anisopliae* é considerado um dos organismos mais promissores no controle de carrapatos e de insetos praga da agricultura e tem sido um dos modelos mais estudados em relação ao isolamento, seleção e caracterização de linhagens do ambiente, elucidação dos mecanismos de infecção e no desenvolvimento de formulações de biopesticidas. O maior entrave para a utilização de fungos no controle biológico é o maior tempo necessário entre a aplicação e a morte dos hospedeiros, em comparação aos pesticidas químicos. Portanto, um dos objetivos comuns é aumentar a velocidade de morte dos hospedeiros. O entendimento das características básicas da relação entre o fungo e o hospedeiro tem permitido o conhecimento da natureza da sua patogenicidade, possibilitando a introdução de genes específicos, altamente expressos em condições de infectividade, visando acelerar o processo de infecção, diminuindo, assim, o tempo entre o início da infecção e a morte do hospedeiro.

O processo de infecção de *Metarhizium* é bastante estudado sendo um dos principais focos de pesquisa para elucidar os mecanismos envolvidos no processo de penetração de hospedeiros. *M. anisopliae* infecta seus hospedeiros em sucessivas fases de germinação, diferenciação, penetração, colonização, reprodução e dispersão (Arruda *et al.*, 2005). A adesão do conídeo à superfície do hospedeiro e subsequente penetração são os eventos iniciais durante o processo de patogenicidade. Após adesão e germinação do conídeo, uma estrutura de penetração é formada na extremidade da hifa germinativa. Esta estrutura de penetração, conhecida como apressório, conta com a ação sinérgica de dois fatores: pressão mecânica e degradação do exoesqueleto do hospedeiro por enzimas hidrolíticas tais quais proteases, quitinases e lipases, relacionadas anteriormente a patogenicidade. Dentro do hospedeiro, o fungo exaure os nutrientes e mata o organismo pela secreção de toxinas, e finalmente, as hifas se exteriorizam na superfície do artrópode morto, conídeos são produzidos e se dispersam para o ambiente.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar o gene que codifica GAPDH em *M. anisopliae* linhagem E6 e analisar seu perfil de expressão.

3.2. Objetivos específicos

Clonagem e caracterização do gene *gpdh1*.

Análise do perfil de transcrição do gene *gpdh1* por experimentos de RT-PCR e “Northern blot”.

4. MANUSCRITO

“Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Metarhizium anisopliae*.” (Manuscrito não submetido)

Autores: Leonardo Broetto, Lenise Palma, Luciano Nakazato, Valéria Dutra, Marilene Henning Vainstein, Augusto Schrank.

Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Metarhizium anisopliae*

Leonardo Broetto^a, Lenise Palma^a, Luciano Nakazato^{a,b}, Valéria Dutra^{a,b},
Marilene Henning Vainstein^{a,d}, Augusto Schrank^{a,c}

^aCentro de Biotecnologia, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, 78.060-600, Cuiabá, MT.

^cDepartamento de Biologia Molecular e Biotecnologia. Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

^d Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P.O. Box 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O.
Box 15005, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.
Phone: (051) 3316-6079
Fax (051) 3316-7309

Abstract

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a classical glycolytic enzyme that plays important roles in various cellular processes. Here we report the sequence and transcriptional analyzes of a regulated gene (*gpdh1*) encoding a GAPDH of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, a well-characterized biocontrol agent of a wide range of arthropods pests. Transcription analyzes show a carbohydrate-dependent expression pattern and a possible involvement of GAPDH in the infection process. Also we observed a regulated transcription pattern in response to carbon sources. These observations lead us to propose new roles to GAPDH in both physiological conditions and infection process.

1. Introduction

Metarhizium anisopliae is a filamentous fungus with the ability to infect and kill a wide range of arthropod hosts. Owing to the wide occurrence of *Metarhizium anisopliae* and its broad spectrum of action, this fungus is considered an effective biological control agent and an important model to study the infection process in arthropods. In Brazil *M. anisopliae* has been used to control insect pests in sugar cane plantations and has a potential application against *Boophilus microplus*, a regional economic important bovine tick (Frazzon et al., 2000). The infection process is well studied and is one of the principal focus of investigation. *M. anisopliae* infects its hosts in successive phases of germination, differentiation, penetration, colonization, reproduction and spread (Arruda et al., 2005). Conidial adhesion to host surface and integument penetration are the initial events during the pathogenic process. After attachment and conidial germination, a penetration structure is formed at the end of germinal hyphae. This penetration structure, named appressorium, relies on the synergistic action of mechanical pressure and enzymatic degradation of the host exoskeleton by hydrolytic enzymes such as proteases, chitinases and lipases some of which were previously related to pathogenesis. Within the host, the fungi exhaust the nutrients and kill the organism by the secretion of toxins, and finally the hypha extrude to the surface of the dead arthropod, producing and spreading conidia to the environment.

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, EC 1.2.1.12) is essential in the glycolysis/gluconeogenesis pathway and catalyzes the oxidative phosphorylation of glyceraldehyde-3-phosphate into 1,3-bisphosphoglycerate in the presence of nicotinamide adenine nucleotide (NAD^+) and inorganic phosphate and, as well as, the inverse reaction. It is a homotetramer, composed of four subunits, each with a molecular mass of 36 kDa. GAPDH is special among the glycolytic enzymes due to its ability to bind NAD^+ or NADH, and also DNA and RNA. Recent studies have demonstrated some unforeseen, non-glycolytic functions of GAPDH in both physiological and pathological processes (Kim and Dang, 2005a). Moreover, in some pathogens such as *Candida albicans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Staphylococcus aureus* and

Streptococcus pyogenes, GAPDH was found on the cell wall, where it may play diverse roles in host-pathogen interactions (Barbosa et al., 2006a).

GAPDH was shown to participate in DNA repair and, although its role in DNA repair complexes has not been established, it has been implicated in telomeric DNA binding (Sundararaj et al., 2004). The function of GAPDH as transcriptional regulator was also demonstrated (Zheng et al., 2003b) a component of the Oct-1 coactivator OCA-S, which is an S-phase-dependent transactivator of the histone H2B gene. GAPDH seems to be a key component in the OCA-S complex.

In addition, other studies have suggested that GAPDH is capable of binding to rRNA, to untranslated regions of several mRNAs and to several viral RNAs (Choudhary et al., 2000; Sioud and Jespersen, 1996). The biological significance of the GAPDH–RNA interaction is poorly understood, but specific association of GAPDH with viral RNA might be involved in the regulation of viral gene expression and translation. Furthermore, GAPDH has been implicated in other processes such as membrane fusion, phosphorylation, tubulin bundling, nuclear RNA export, DNA repair and interaction with cellular components, including RNA, dinucleoside polyphosphate and nitric oxide (Sirover, 1996; Sirover, 1997; Sirover, 1999b).

Here we report the isolation and characterization of cDNA and genomic clones encoding an orthologue of GAPDH in *Metarhizium anisopliae*. We have demonstrated that the expression of GAPDH is regulated in *M. anisopliae* in response to carbon source and conditions that mimic arthropod infection.

2. Materials and methods

2.1. Organisms and culture conditions

Metarhizium anisopliae E6 isolate was originally isolated from infected insects (Rosato et al., 1981). Cultures were maintained on complete Cove's medium (Bogo et al., 1998).

2.2. Standard DNA manipulations, Southern blot analysis, screening of cDNA library, gene cloning and sequencing

DNA manipulations were carried out according to standard procedures (Sambrook and Russel, 2001). Genomic DNA extraction from *M. anisopliae* was according to Bogo et al., 1998.

In all DNA hybridization experiments, a previously isolated EST coding for GAPDH was used as a probe (Dutra et al., 2004b). Southern blot analyses were performed using Gene Images labeling and detection system (Amersham Biosciences) according to standard procedures. The cDNA library, constructed using SuperScript Lambda System for cDNA Synthesis and λ Cloning (GIBCO BRL) from poly(A⁺) RNA isolated from *M. anisopliae* grown on medium supplemented with 1% *Boophilus microplus* cuticle (Dutra et al., 2004), was screened using the enhanced chemiluminescence (ECL) direct nucleic acid labeling and detection systems (Amersham Biosciences) according to standard procedures. Primers were designed within 5' and 3' partial sequences (GPDMACDS1, 5' TTGTCCGCTCTCTCCATATACAC 3'; GPDMACDS2, 5' TCCATTCGGTTACTCTCTTATTTTC 3') and used on RT-PCR amplification and genomic DNA PCR amplification, performed as described by Sambrook and Russel (2001). The amplicons were cloned into pUC18 vector for sequencing with the DYEnamic ET Dye Terminator kit in the MegaBace 1000 System (Amersham Biosciences). Contigs were assembled with Staden package program (Bonfield et al., 1995).

2.3. Sequence alignment and phylogenetic analysis

The predicted amino acid sequence from *M. anisopliae* GAPDH was aligned with orthologues from several related fungi species using ClustalX 1.83 (Thompson et al., 1997). The phylogenetic trees were made using Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 3.1) software (Kumar et al., 2004) by neighbor-joining method with Poisson correction, confidence was evaluated by 10,000 bootstrap replications.

2.4. RNA extraction, cDNA synthesis and Northern blot analysis

Total RNA was extracted as described by Dutra et al. (2004). Total RNA fated to cDNA synthesis was extracted from mycelium grown for 16h, 24h, 32h

and 56h in liquid medium with 0.6% (w/v) NaNO₃ amended with 1% (w/v) cuticle from insect *Dysdercus peruvianus* and from liquid medium with 0.6% (w/v) NaNO₃ amended with 1% (w/v) glucose and cultures were shaken (150 RPM) at 28 °C at initial cell density of 10⁶ conidia ml⁻¹. First-strand cDNA synthesis was performed with reverse transcriptase (MMLV reverse transcriptase) using 1 µg of RNA and 3' BD SMART CDS Primer II A (Clontech Laboratories): 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT₍₃₀₎V N -3', where (N = A, C, G, or T; V = A, G, or C). First-strand cDNA was used as template to semi-quantitative PCRs using Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) and the primers GPDMACDS1 and GPDMACDS2 (to amplifications). The normalizations were made using primers amplifying *M. anisopliae tef1-α* gene (Nakazato et al., 2006), coding for the translation elongation factor 1 *alpha*, as a control of first strand cDNA template loaded in reactions.

Total RNA fated to Northern blot analysis was extracted from grown mycelium from 24h liquid MCc medium. Cultures were harvested and washed with sterile distilled water. The mycelium was transferred to liquid medium with 0.6% (w/v) NaNO₃ amended with either 1% (w/v) glucose, 20mL/L (v/v) glycerol, or 5mL/L (v/v) ethanol for 4h, cultures were shaken (150 RPM) at 28 °C. Northern blot was made using the protocol described by Memelink et al., (1994). Approximately 10 µg total RNA was loaded onto 1.2% formaldehyde containing agarose gel, subjected to electrophoresis, and transferred to nylon filters (Amersham Biosciences). Filters were hybridized to radiolabeled [α -³²P] dNTP probes by random priming protocol as described by Sambrook and Russel (2001). A cDNA clone coding to *M. anisopliae gpdh1* gene was used as probe and the entire *M. anisopliae tef1-α* gene was used as control of loaded total RNA samples. Normalization of total RNA loaded was made using rRNA in agarose gel with ethidium bromide stain.

3. Results and discussion

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) coding genes were isolated from several fungi. Well known as a classical glycolytic enzyme encoded by a so-called “housekeeping gene”, is commonly misused as a control in gene expression studies. The most often primary objective to isolate

and characterize *gpdh1* genes is the isolation of the promoter region aiming the isolation of a strong signal for transcription initiation (Alves et al., 2004;Kuo et al., 2004;Pachlinger et al., 2005). However, many studies have demonstrated the regulation of both transcription and translation of GAPDH, as well as the involvement of this enzyme in infectivity (Barbosa et al., 2006; Kim and Dang 2005).

It should be noted that sometimes there is some confusion in the literature about the nomenclature of the genes coding GAPDH (EC 1.2.1.12) and those coding for GPD (glycerol- phosphate dehydrogenase, EC 1.1.1.8). For this reason we will refer to the gene coding GAPDH as *gpdh1* gene.

During the search of differentially expressed sequences in cuticle infection, it has been found a 600 bp sequence with identity to GAPDH from other fungi (Dutra et al., 2004). The DNA fragment was used as probe in Southern blots to demonstrate that the sequence is present in *M. anisopliae* genome as a single copy (Figure 1).

Seeking isolation of the complete *gpdh1* gene from *M. anisopliae*, clones were isolated from a cDNA library. The isolated cDNAs were used to design 5' and 3' ends primers for PCR direct amplification of the entire GAPDH coding gene. Using cDNA and genomic DNA amplicons ranging from 1.2 kb to 1.4 kb, respectively, were cloned into pUC18 vector. The length difference between amplicons concern to the presence of one intron ranging from nucleotide 173 till 387 (~200pb). The entire amplicons were sequenced and assembled in contigs (Figure 2). The ORF from *gpdh1* gene predicts a 337 amino acid residues protein with an estimated MW of 36 kDa and theoretical pI of 8.26. The proteins databank analysis for conserved domains was not found none other domain apart from expected NAD binding domain (from Val4 to Cys151) and C-terminal domain (from Leu156 to Tyr313)(Figure 2). The putative *M. anisopliae* GAPDH was aligned to orthologues from several related fungi species, with high identities and similarity values (Table 1), and a phylogenetic tree was built (Figures 3). The phylogenetic analysis showed a distribution in agreement with the gene structure found in the literature and one intron at a very similar position (Jungehulsing et al., 1994;Ridder and Osiewacz, 1992;Templeton et al., 1992).

RT-PCR experiments were conducted to investigate the transcription pattern of *gpdh1* gene in *M. anisopliae* cultivated in the presence of insect

cuticle (1% exoskeleton from *D. peruvianus*, mimicking host infection) and basal medium where 1% glucose was the readily source of energy (Figura 4). A sharp increase of *gpdh1* transcript levels was observed after 32 h incubation in the presence of cuticle as compared to the glucose added culture. The increase of *gpdh1* transcripts can be attributed to an increase in hydrolytic enzymes acting on the cuticle substrate, whose degradation would release monosaccharides, as N-acetylglucosamine, that induces the *gpdh1* gene transcription. Cultures from basal medium showed a gradual increase of *gpdh1* transcript levels due to glucose reposition during incubation, leading to an accumulation of the sugar (detected by sugar reduction assays, not shown). In both conditions increased *gpdh1* transcript levels were related to the availability of monosaccharide in the medium, consistent with a carbohydrate-dependent expression pattern, as shown in other reports (Larsen et al., 2004;Shinohara et al., 1998). On the other hand, if the two conditions are compared at 16 h of culture, a pronounced increase of the *gpdh1* transcript levels occurs in the presence of cuticle, suggesting a possible involvement of *M. anisopliae* GAPDH in the infection process. This corroborates previous detection of differential expression of *gpdh1* in simulated infective conditions (Dutra et al., 2004).

The transcription pattern of the *M. anisopliae gpdh1* gene in response to carbon sources was analyzed by Northern blot. Total RNA extracted from *M. anisopliae* cultivated in medium added of glucose, glycerol or ethanol was probed with the *M. anisopliae gpdh1* cDNA radiolabeled fragment. *gpdh1* transcript levels are highly reduced in presence of glycerol and ethanol as compared to the culture added of glucose (Figure 5). This higher expression of *gpdh1* in presence of glucose and significantly lower expression in glycerol and ethanol means primarily that its transcription is regulated in response to carbon source. Indeed, in *Mucor circinelloides* the ortholog *gpd1* gene was shown to have a well defined transcription pattern primarily regulated in response to carbon source by a mechanism that includes a negative regulator (Larsen et al., 2004). As depicted in Figure 5, an unanticipated reduction of transcripts occurred for the translation factor EF1- α (*tef1- α* gene from *M. anisopliae*; Nakazato et al., 2006) in the presence of both ethanol and glicerol. Similar results were described for yeast and mammalian cells (Ashe et al., 2000;Browne and Proud, 2002). Under conditions of temporarily increased

energy demand or decreased energy supply, it would be advantageous for the cell to reduce the rate of protein synthesis, to allow energy to be diverted to other processes, such as maintaining the plasma membrane potential and ion gradients. Again, inhibition of elongation will ensure that polysomes are retained, with advantages for mRNA stability and for the rapid resumption of translation once energy availability improves again.

The behavior of *gpdh1* gene transcription in *M. anisopliae* in response to different carbon sources lead us to infer that glycerol and ethanol should be assimilated directly by the citric acid cycle pathway and oxidative phosphorylation chain. Because of the lack of glucose in these conditions the *gpdh1* gene transcripts should be strongly repressed. These assumptions raise interesting speculations that in *M. anisopliae*, as in other filamentous fungi such as *Trichoderma reesei*, prevails the aerobic metabolism. (Chambergo et al., 2002b). A well-known mechanism of carbon catabolism gene tuning, dependent on the available substrate, is the carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. When grown on complex substrates containing both metabolically favorable carbon sources (such as glucose) and less favorable ones (such as ethanol and glycerol), *A. nidulans* is able to repress the genes involved in the utilization of the less favorable carbon sources. Therefore the fungus will utilize the favorable carbon sources first, thereby saving resources by not producing enzymes for the assimilation of less favorable substrates before they are needed. An important regulatory protein controlling carbon repression in *A. nidulans* is CreA (Mogensen et al., 2006b).

As for *M. anisopliae* *gpdh1* gene regulation in response to different carbon sources, in absence of glucose, and availability of alternative carbon sources (glycerol or ethanol) repression would occur (by an unknown repressor) whereas the alternative carbon source assimilation system should be de-repressed by the absence of a repressor (possibly a CreA repressor ortholog).

A possible involvement of *M. anisopliae* GAPDH in the host-infection process can suggest by the increased level of transcripts in presence of cuticle (our results and Dutra et al., 2004). One of the possible roles of GAPDH in infection could be as an adhesin during initial contact between the spore and the cuticle as occurs in other pathogenic fungi and their host (Alderete et al., 2001a). The inhibition of the host immune system could also occur through a

molecular mimicry mechanism, since the fungal GAPDH share high identity with the host GAPDH which could lead to a lack of recognition of the pathogen by the host immune system (Goudot-Crozel et al., 1989).

Recent studies have demonstrated the involvement of GAPDH from the pathogen in host adhesion and invasion. The regulation of transcripts and enzyme production has been shown to be regulated in several physiological conditions during fungi growth. Data herein presented may indicate a possible involvement of *M. anisopliae* GAPDH in the infection process and in the carbon source regulated transcription response of *M. anisopliae gpdh1* gene.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CAPES, CNPq, Fapergs, PROCAD and Projeto Rede Sul de Análise de Genomas. We thank Irene S. Schrank for critical reading this manuscript.

Table 1

Identity and similarity (conservative substitutions) values from sequence alignment of the predicted amino acid sequence from *M. anisopliae* GAPDH with orthologues from several related fungi species and *Escherichia coli* (as outgroup sequence).

Microorganisms	Identity	Similarity
<i>Agaricus bisporus</i> (AAA32634)	72%	82%
<i>Aspergillus nidulans</i> (AAA33307)	77%	86%
<i>Aspergillus niger</i> (CAA67966)	78%	88%
<i>Aspergillus oryzae</i> (BAB12234)	76%	87%
<i>Candida albicans</i> (AAC49800)	67%	81%
<i>Claviceps purpurea</i> (CAA51721)	91%	95%
<i>Cryphonectria parasitica</i> (P19089)	82%	91%
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (AAA02485)	86%	93%
<i>Glomerella cingulata</i> (AAA02486)	86%	93%
<i>Lentinula edodes</i> (BAA83550)	73%	81%
<i>Mucor racemosus</i> 1 (Q9C136)	67%	79%
<i>Mucor racemosus</i> 2 (Q96UF2)	70%	81%
<i>Mucor racemosus</i> 3 (Q96UF1)	67%	78%
<i>Neurospora crassa</i> ccg7 (AAB95425)	84%	91%
<i>Neurospora crassa</i> (AAB00570)	84%	91%
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (AAP42760)	76%	86%
<i>Pichia pastoris</i> (AAC49649)	64%	79%
<i>Pichia ciferri</i> (AAF21710)	64%	79%
<i>Podospora anserina</i> (P32637)	83%	91%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> tdh1 (P00360)	63%	79%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> tdh2 (P00358)	63%	78%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> tdh3 (P00359)	63%	79%
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (P78958)	68%	80%
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (O43026)	67%	80%
<i>Sordaria macrospora</i> (CAC86412)	85%	91%
<i>Trichoderma harzianum</i> (CAA73141)	77%	87%
<i>Ustilago maydis</i> (CAA30726)	74%	81%
<i>Escherichia coli</i> (AAA23856)	56%	71%

Figure Legends

Fig. 1 Southern blot analysis of the genomic DNA of *Metarhizium anisopliae*. DNA was digested with BamHI (Lane 3), EcoRI (Lane 4), PstI (Lane 5) and Sall (Lane 6). A 600 pb EST was used as probe and was used as positive control (Lane 1). Lambda DNA digested with HindIII was used as molecular size marker (Lane 2), respective molecular sizes were shown in left (kilobase).

Fig. 2. Sequence and schematic diagram of the *gpdh1* gene from *M. anisopliae*. (A) Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *gpdh1* *M. anisopliae* gene. Exons are in upper-case letter, all other sequences are in lower-case letters. Intron is indicated. Start and stop codons are underlined and in bold. A dashed underlining indicates the putative Poly(A) signal. The deduced amino acid sequence is shown above the nucleotide sequence (single letter code). Circles mark the first (Val4) and last (Cys151) amino acid residues of the NAD binding domain. (B) Schematic diagram of the exons and introns positions in the genomic *gpdh1*. Grey arrows indicate the exons location. Numbers in brackets indicate the positions of respective restriction enzyme cutting sites for the *gpdh1* gene. Primers are signed by black arrows.

Fig. 3. Phylogenetic neighbor-joining tree of *M. anisopliae gpdh1* gene deduced amino acid sequence. The amino acid sequences from the following microorganisms were used: *Agaricus bisporus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida albicans*, *Claviceps purpurea*, *Cryphonectria parasitica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Glomerella cingulata*, *Lentinula edodes*, *Mucor racemosus*, *Neurospora crassa*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pichia pastoris*, *Pichia ciferrii*, *Podospora anserina*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Sordaria macrospora*, *Trichoderma harzianum*, *Ustilago maydis* and *Escherichia coli* outgroup sequence (GenBank accession numbers are beside species name). The tree confidence was confirmed by 10,000 bootstraps. *M. anisopliae* sequence is highlighted by black triangle.

Fig. 4. RT-PCR analysis. Transcript levels of *gpdh1* from mRNA of *M. anisopliae* cultivated in 1% of exoskeleton and 1% glucose, in upper panel. Pos, PCR amplification from the total genomic DNA. Neg, no template reaction. *tef1- α* gene load control normalization in lower panel.

Fig. 5. Northern blot analysis of *gpdh1* transcript levels. Total RNA was isolated from *M. anisopliae* grown in medium with either glucose (Glu), glycerol (Gly), or ethanol (EtOH) added. The blots were hybridized with a 1.3-Kb *gpdh1* probe, and 1.8-Kb *tef1- α* normalization gene probe. Bottom: agarose gels with ethidium bromide-stained RNA showing 28S and 18S rRNA as loading controls.

Figure 1

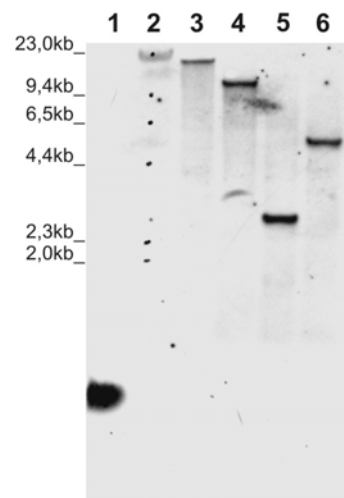


Figure 2

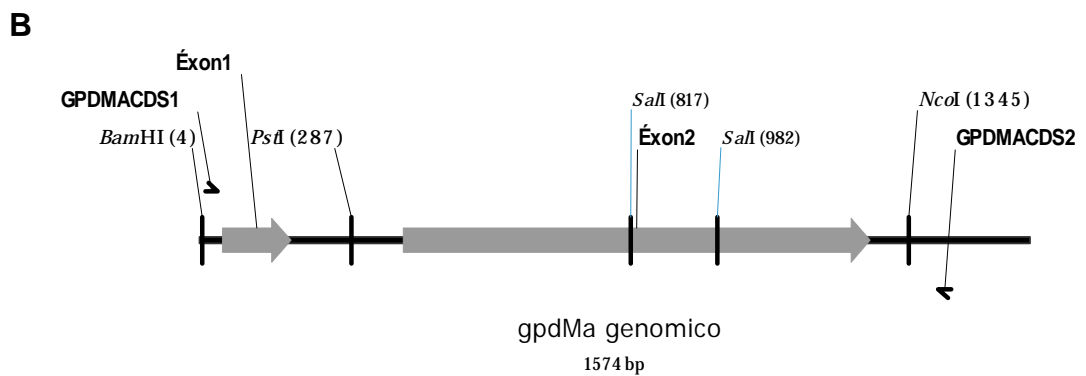
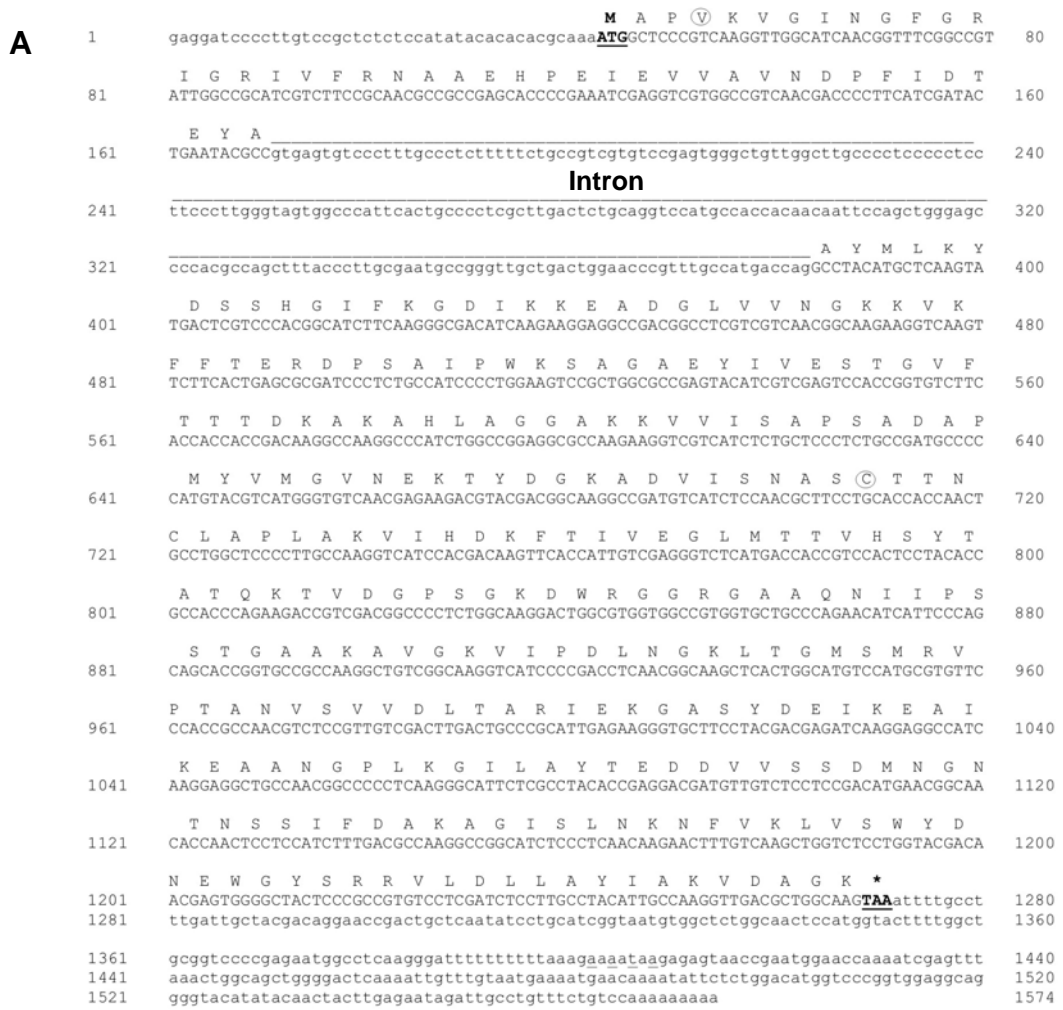


Figure 3

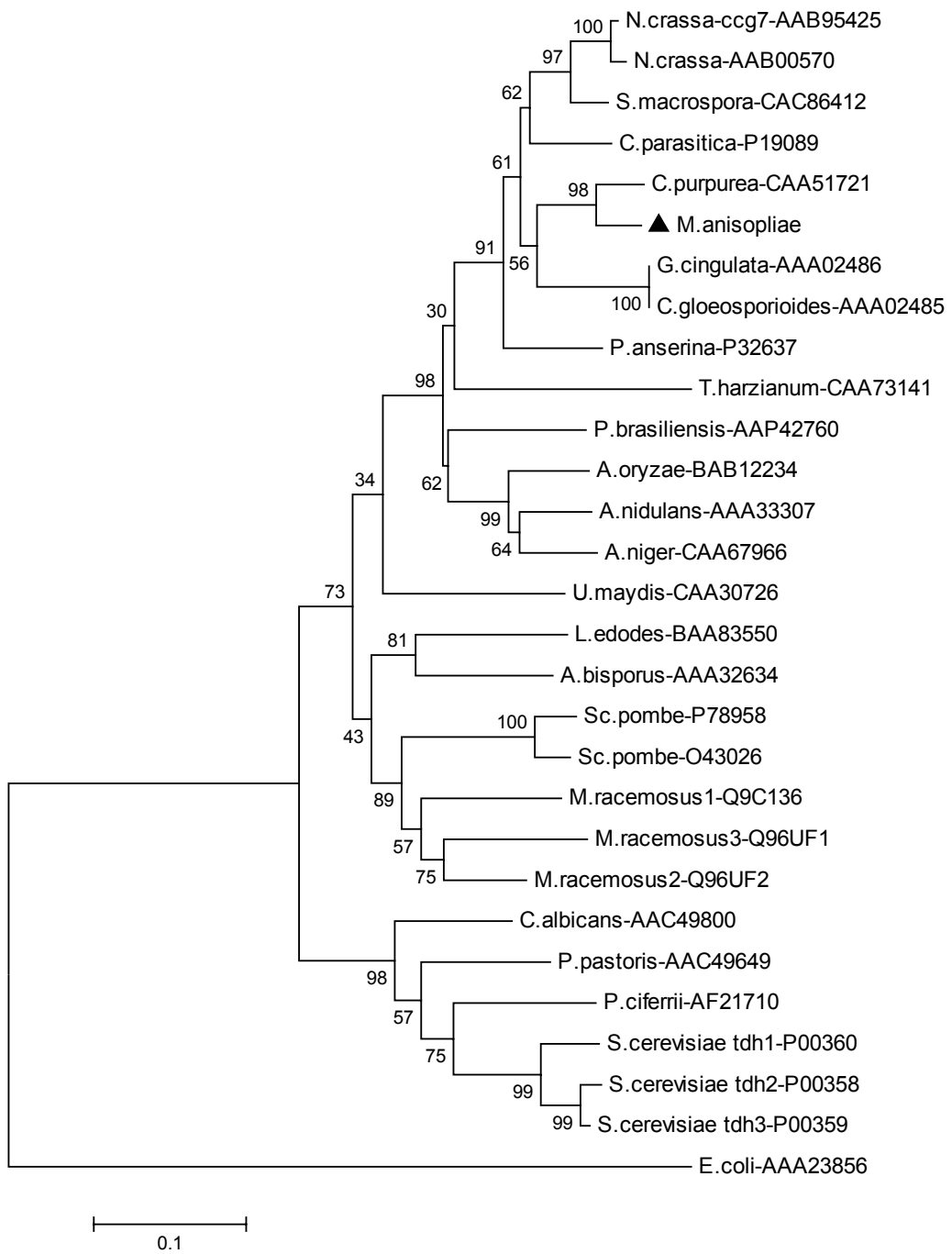
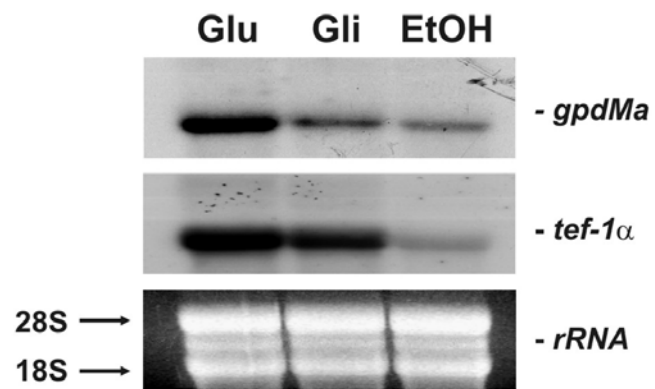


Figure 5



5. DISCUSSÃO

Conhecida classicamente como uma enzima glicolítica citosólica, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é codificada por genes até pouco tempo enquadrados como genes de manutenção celular (“*housekeeping genes*”) que comumente são usados, algumas vezes equivocadamente, para o controle interno de quantidade de RNA em estudos da expressão gênica. As características de multifuncionalidade da proteína GAPDH têm se tornado cada vez mais evidentes à medida que novas investigações de suas outras funções são realizadas. Assim, novas funções têm sido atribuídas a esta clássica enzima da via glicolítica, com implicações em regulação tanto fisiológica como na interação patógeno / hospedeiro (Kim e Dang, 2005;Barbosa *et al.*, 2006).

A constatação da inesperada expressão aumentada do gene *gpdh1* de *M. anisopliae* em condições de cultivo que mimetizam a infecção em hospedeiros (Dutra *et al.*, 2004), deu origem à hipótese de um possível envolvimento da proteína GAPDH no processo de infecção de *M. anisopliae*. A fim de verificar a multiplicidade de cópias dessa EST no genoma de *M. anisopliae*, foi realizada a análise por “*Southern blot*” mostrando que mesmo em condições de hibridização em baixa estrigência, apenas uma cópia do gene *gpdh1* está presente no genoma. De uma maneira geral, respeitando algumas exceções, verificamos um padrão de multiplicidade de cópias em fungos leveduriformes, como por exemplo em *Saccharomyces cerevisiae* (Delgado *et al.*, 2001) e *Schizosaccharomyces pombe* (Mitsuzawa *et al.*, 2005), e uma única cópia em fungos filamentosos como em *Claviceps purpurea* (Jungehulsing *et al.*, 1994) e *Aspergillus nidulans* (Punt *et al.*, 1988).

Após nos certificarmos da presença de uma cópia única do gene *gpdh1* no genoma de *M. anisopliae*, buscamos o isolamento do gene completo. Após a clonagem e o seqüenciamento do gene *gpdh1*, verificamos que a seqüência genômica é constituída por 1,4 kb, é interrompida por um único íntron de 200 pb, e que a seqüência apresenta uma ORF de 337 resíduos de aminoácidos com massa molecular estimada de 36 kDa e pl teórico de 8,26. A suposta seqüência de GAPDH de *M. anisopliae* foi alinhada com ortólogos de diversos fungos, filamentosos e leveduriformes, e uma árvore filogenética foi construída.

A análise filogenética gerou uma distribuição de agrupamentos entre as espécies em acordo com os dados encontrados na literatura para a estrutura gênica de *gpdh1*, com a presença de um único íntron com localização conservada entre os ortólogos (Jungehulsing et al., 1994; Ridder e Osiewacz, 1992; Templeton et al., 1992). Além disso, é evidente a distância filogenética entre o agrupamento de fungos filamentosos, no qual está incluído *M. anisopliae*, o agrupamento dos fungos basidiomycota, como por exemplo, *Agaricus bisporus* e *Lentinula edodes* e o agrupamento dos fungos leveduriformes, como por exemplo *Candida albicans* e *Pichia pastoris*. Apesar dessa distância entre os diferentes grupos taxonômicos, verificamos uma grande conservação entre os ortólogos de *gpdh1* em todos os fungos.

Com o intuito de analisar o perfil de transcrição do gene *gpdh1* de *M. anisopliae* foram comparadas uma condição de infecção a uma condição de cultivo em meio de cultura rico. Experimentos de RT-PCR foram realizados utilizando RNA extraído do fungo cultivado em meio contendo exoesqueleto de inseto, mimetizando assim a infecção, e em meio de cultivo rico contendo glicose e fonte mineral de nitrogênio. A primeira observação relevante que pôde ser feita desse experimento é que existe um aumento súbito nos níveis de transcritos do gene *gpdh1* na condição de infecção, após 32 h de incubação.

Esse aumento repentino dos níveis de transcritos do gene *gpdh1* pode ser atribuído a uma maior disponibilidade de monossacarídeos no meio, como por exemplo, N-acetilglicosamina, derivados da digestão do substrato encontrado no exoesqueleto (quitina) por ação de enzimas hidrolíticas, como as quitinases. Essa elevação nos níveis de monossacarídeos poderia estimular não só uma elevação nos níveis de transcritos do gene *gpdh1*, como provavelmente também, os níveis de transcritos de outros genes envolvidos no metabolismo energético. Com base nesse mesmo princípio podemos sugerir que a elevação dos níveis de transcritos do gene *gpdh1* em culturas acrescidas de glicose possa resultar do acúmulo do açúcar no meio de cultura, ocasionado pela reposição exógena a cada 16 h de incubação. A incapacidade do fungo em assimilar todo o substrato adicionado ocasionando seu acúmulo gradual foi detectado por ensaios de açúcar redutor (dados não mostrados). Em ambas as condições acima discutidas foi possível observar um claro padrão de acúmulo

de transcritos do gene *gpdh1* frente a uma maior disponibilidade de monossacarídeos no meio de cultura.

Esse padrão de expressão carboidrato-dependente foi também descrito em outros fungos relacionados (Larsen et al., 2004; Shinohara et al., 1998; Wolff e Arnau, 2002). Mesmo assim, é evidente o aumento dos níveis de transcritos do gene *gpdh1* nos cultivos com cutícula de hospedeiros que, em princípio, mimetizam a infecção. Esse aumento na expressão do gene *gpdh1* permite supor o envolvimento da proteína GAPDH no processo de infecção, possivelmente em relação à adesão do esporo / tubo germinativo na superfície do hospedeiro, assim como na etapa de colonização, como sugerido em sistemas semelhantes (Barbosa et al., 2006). Esse resultado corrobora a descrição de expressão diferencial de *gpdh1* em *M. anisopliae* na presença de cutícula (Dutra et al., 2004).

Além da possível função de adesão que a proteína GAPDH desempenharia durante os primeiros momentos do processo de infecção, é possível que também participe na inibição da resposta imune elicitada pelo hospedeiro. A grande identidade da seqüência peptídica de GAPDH compartilhada entre o patógeno e o hospedeiro poderia permitir o escape do fungo do reconhecimento pelo hospedeiro, um provável mecanismo de mimetismo molecular (Alderete et al., 2001b). Em *M. anisopliae* foi demonstrado que o transcrito do gene *Mcl1* (“*Metarhizium collagen-like protein*”) é detectado 20 min após o contato do fungo com a hemolinfa do hospedeiro. O gene *Mcl1* codifica uma proteína com um domínio hidrofílico N-terminal que é apresentado na superfície celular. MCL1 desempenharia a função de formar um revestimento protetor anti-adesão, protegendo o fungo da fagocitose e do encapsulamento exercidos pela resposta imune do hospedeiro (Wang e St Leger, 2006).

Com o intuito de analisar o perfil transcricional do gene *gpdh1* de *M. anisopliae* frente ao cultivo em diferentes fontes de carbono, experimentos de “*Northern blot*” foram realizados. Tanto o etanol quanto o glicerol, quando presentes como única fonte de carbono em meios de cultivo, têm a capacidade de induzir a expressão de genes envolvidos no metabolismo de fontes de carbono menos favoráveis em fungos; contrariamente, nestas condições, ocorreria a repressão da expressão de genes envolvidos na glicólise

(Mogensen *et al.*, 2006). Logo, analisamos o perfil transcricional do gene *gpdh1* a partir de RNAs extraídos de cultivos adicionados de glicose, ou glicerol, ou etanol. Inicialmente observamos que há um aumento nos níveis de transcritos na condição de cultivo em glicose em relação às condições em glicerol e etanol. Esse padrão de transcrição nos leva a sugerir que o gene *gpdh1* sofre regulação em resposta a diferentes fontes de carbono, como ocorre em outros sistemas (Larsen *et al.*, 2004), onde, aparentemente, existiria um sistema de repressão atuando transcionalmente sob *gpdh1* na ausência de glicose.

O padrão de transcrição do gene *gpdh1*, em *M. anisopliae*, quando na presença de diferentes fontes de carbono nos leva a inferir que, tanto o glicerol quanto o etanol, estariam sendo metabolizados diretamente via ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa. Concomitantemente, a ausência de glicose nesses meios reduziria fortemente os níveis de transcritos do gene *gpdh1*. Nesta condição havendo outra fonte de carbono disponível para o fungo (glicerol ou etanol) ocorreria a não repressão de genes envolvidos na assimilação destes substratos. No fungo filamentosso *Aspergillus nidulans* foi descrito um sistema de modulação do metabolismo de carbono que pode servir de modelo comparativo. Quando cultivado em um substrato complexo contendo tanto fonte de carbono metabolicamente favorável (como a glicose) e uma menos favorável (como o glicerol ou o etanol), *A. nidulans* tem a capacidade de reprimir a transcrição dos genes envolvidos na utilização daquelas fontes de carbono menos favoráveis. Esse sistema de repressão é conhecido como repressão por carbono, sendo que o fungo utilizará inicialmente a fonte de carbono mais favorável e não sintetizará as enzimas envolvidas no metabolismo de fontes de carbono menos favoráveis, evitando assim o consumo desnecessário de energia.

Uma importante proteína reguladora que controla esse sistema em *A. nidulans* é CreA (Mogensen *et al.*, 2006a). Um sistema de regulação poderia operar de maneira semelhante em *M. anisopliae*, quando na presença de fontes de carbono como glicerol e etanol e na ausência de glicose, um repressor poderia inibir a transcrição de genes glicolíticos como *gpdh1*, enquanto que a transcrição de genes envolvidos no metabolismo tanto do glicerol como do etanol, não seria reprimida, possivelmente por um ortólogo de

CreA. Realmente, o gene *crr1*, um ortólogo do gene *creA*, codificando CreA em *A. nidulans*, foi isolado em *M. anisopliae* (Screen *et al.*, 1997).

A hipótese de assimilação direta dos substratos glicerol e etanol, via Ciclo do Ácido Cítrico e Fosforilação oxidativa, nos leva a sugerir que em *M. anisopliae*, assim como em outros fungos filamentosos, como, por exemplo, *Trichoderma reesei*, prevaleceria o metabolismo aeróbio (Chambergo *et al.*, 2002).

As rotas de respiração aeróbia e de fermentação são utilizadas pelos microrganismos para obter energia da glicose. Essas rotas permitem aos microrganismos a produção de ATP em diferentes taxas e com diferentes eficiências; a respiração aeróbia ocorre a uma baixa taxa, mas com alta produção, enquanto que a fermentação opera sob altas taxas, mas com baixa produção de ATP. A pressão seletiva imposta pela limitação de energia e pela alta produção de ATP da respiração aeróbia teria assim facilitado a transição evolucionária de organismos unicelulares para organismos multicelulares. Microrganismos unicelulares utilizam ambas as rotas, dependendo da condição metabólica da célula. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* preferencialmente fermenta glicose, mesmo na presença de oxigênio, produzindo etanol e CO₂. Apenas após a exaustão da glicose disponível no meio é que a respiração aeróbia é ativada e a levedura utiliza então o etanol como fonte de carbono e energia para o metabolismo aeróbio. Essa alteração de fermentação para respiração aeróbia é conhecida como fase diáuxica. Entretanto, microrganismos multicelulares como os fungos filamentosos utilizam preferencialmente a respiração aeróbia o que embasa a hipótese de que também em *M. anisopliae* prevaleceria o metabolismo aeróbio (Chambergo *et al.*, 2002a).

Uma provável explicação para a preferência de *M. anisopliae*, e outros fungos filamentosos, pelo metabolismo aeróbio poderia se basear no seu habitat nutricionalmente pobre e por possuir uma demanda maior de energia (por ser multicelular) quando comparado a microrganismos unicelulares. Logo, a “preferência” de *M. anisopliae* pelo metabolismo aeróbio se justificaria na necessidade de obter mais energia a partir do substrato disponível. Em especial, no caso de *M. anisopliae*, na natureza e na ausência de hospedeiros existe uma limitação muito grande de substrato. Por ocasião da infecção de um

hospedeiro artrópode, por exemplo, o fungo multicelular tende a utilizar por completo todo o substrato disponível fazendo uso do metabolismo aeróbio, que permite a utilização mais eficiente dos substratos.

Estudos recentes descrevem o envolvimento da proteína GAPDH de microrganismos patógenos em seu processo de infecção, principalmente no seu estabelecimento em seus hospedeiros. A regulação da transcrição de genes codificando GAPDH, assim como da tradução da proteína GAPDH, tem sido descritas em várias condições fisiológicas durante o desenvolvimento de fungos. Os dados obtidos no presente trabalho podem indicar um possível envolvimento da proteína GAPDH de *Metarhizium anisopliae* no processo de infecção, assim como sugerem um padrão de regulação da transcrição do gene *gpdh1* de *M. anisopliae* em resposta a disponibilização de diferentes fontes de carbono.

6. CONCLUSÕES

i) O gene *gpdh1* está presente em uma única cópia no genoma de *M. anisopliae*.

ii) A análise filogenética com ortólogos em fungos revelou uma distribuição em acordo com a estrutura gênica de *gpdh1* encontrada na literatura, com a presença de um único íntron com localização conservada entre os ortólogos.

iii) Existe um claro padrão de acúmulo dos transcritos de *gpdh1* frente a uma maior disponibilidade de monossacarídeos para o fungo.

iv) Há um acúmulo nos níveis de transcritos do gene *gpdh1* também em cultivos mimetizando a infecção, o que permite a suposição do envolvimento da proteína GAPDH no processo de infecção.

v) O gene *gpdh1* sofre regulação em resposta a diferentes fontes de carbono.

vi) A hipótese de assimilação direta dos substratos glicerol e etanol, via ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa nos levam a acreditar que em *M. anisopliae* prevaleceria o metabolismo aeróbio.

7. PERSPECTIVAS

i) Verificar a existência de possíveis isoformas de GAPDH de *M. anisopliae*, pela geração de anti-soro anti-GAPDH, “Western blot” de géis bidimensionais e subsequente identificação por espectrometria de massas.

ii) Verificar possíveis alterações nos níveis protéicos de GAPDH e nos níveis de transcrito do gene *gpdh1* em condições mimetizando a infecção, em condições metabólicas e em condições de estresse celular, por “Western blot” unidimensional, “Northern blot” e ensaio de atividade enzimática.

iii) Analisar a localização sub-celular das possíveis isoformas de GAPDH e inferir no possível envolvimento desta em funções não relacionadas à glicólise, utilizando detecção por “Western blot” de GAPDH em extratos de parede celular de *M. anisopliae*, fusão de GAPDH com GFP e transformação para a análise “in vivo” por microscopia confocal e imunomicroscopia eletrônica de transmissão.

iv) Verificar a existência de interação entre GAPDH de *M. anisopliae* e o exoesqueleto de artrópodes, utilizando tratamento com anti-soro anti-GAPDH seguido de bioensaio e detecção de interação proteína-proteína utilizando “Far-western” de frações de exoesqueleto.

8. Referências

- Alderete, J.F., K.W.Millsap, M.W.Lehker, and M.Benchimol. 2001. Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. *Cell Microbiol.* 3:359-370.
- Almeida, C., O.Queiros, A.Wheals, J.Teixeira, and P.Moradas-Ferreira. 2003. Acquisition of flocculation phenotype by *Kluyveromyces marxianus* when overexpressing GAP1 gene encoding an isoform of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Microbiol. Methods* 55:433-440.
- Alves, A.M., E.Record, A.Lomascolo, K.Scholtmeijer, M.Asther, J.G.Wessels, and H.A.Wosten. 2004. Highly efficient production of laccase by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6379-6384.
- Arruda, W., I.Lubeck, A.Schrank, and M.H.Vainstein. 2005. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Exp. Appl. Acarol.* 37:231-244.
- Ashe, M.P., S.K.De Long, and A.B.Sachs. 2000. Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast. *Mol. Biol. Cell* 11:833-848.
- Barbosa, M.S., S.N.Bao, P.F.Andreotti, F.P.de Faria, M.S.Felipe, F.L.dos Santos, M.J.Mendes-Giannini, and C.M.Soares. 2006. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect. Immun.* 74:382-389.
- Barbosa, M.S., D.A.Cunha Passos, M.S.Felipe, R.S.Jesuino, M.Pereira, and C.M.de Almeida Soares. 2004. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homologue is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular and phylogenetic analysis. *Fungal. Genet. Biol.* 41:667-675.
- Bogo, M.R., C.A.Rota, H.Pinto, Jr., M.Ocampos, C.T.Correa, M.H.Vainstein, and A.Schrank. 1998. A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Curr. Microbiol.* 37:221-225.

- Bonfield, J.K., K.Smith, and R.Staden. 1995. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.* 23:4992-4999.
- Browne, G.J. and C.G.Proud. 2002. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 269:5360-5368.
- Chambergó, F.S., E.D.Bonaccorsi, A.J.Ferreira, A.S.Ramos, J.Ferreira, Jr., J.brahao-Neto, J.P.Farah, and H.El-Dorry. 2002b. Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. *J. Biol. Chem.* 277:13983-13988.
- Choudhary, S., B.P.De, and A.K.Banerjee. 2000. Specific phosphorylated forms of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase associate with human parainfluenza virus type 3 and inhibit viral transcription in vitro. *J. Virol.* 74:3634-3641.
- Delgado, M.L., J.E.O'Connor, I.Azorin, J.Renau-Piqueras, M.L.Gil, and D.Gozalbo. 2001. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TDH1, TDH2 and TDH3 genes are also cell wall proteins. *Microbiology* 147:411-417.
- Dutra, V., L.Nakazato, L.Broetto, S.Silveira, I, V.M.Henning, and A.Schrank. 2004b. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. *Res. Microbiol.* 155:245-251.
- Frazzon, A.P., V.J.da Silva, I, A.Masuda, A.Schrank, and M.H.Vainstein. 2000. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 94:117-125.
- Gil-Navarro, I., M.L.Gil, M.Casanova, J.E.O'Connor, J.P.Martinez, and D.Gozalbo. 1997. The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J. Bacteriol.* 179:4992-4999.
- Goudot-Crozel, V., D.Caillol, M.Djabali, and A.J.Dessein. 1989. The major parasite surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis is a 37-kD glyceraldehyde-3P-dehydrogenase. *J. Exp. Med.* 170:2065-2080.
- Gozalbo, D., I.Gil-Navarro, I.Azorin, J.Renau-Piqueras, J.P.Martinez, and M.L.Gil. 1998. The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect. Immun.* 66:2052-2059.

- Greene, A.V., N.Keller, H.Haas, and D.Bell-Pedersen. 2003. A circadian oscillator in *Aspergillus* spp. regulates daily development and gene expression. *Eukaryot. Cell* 2:231-237.
- Holland, J.P. and M.J.Holland. 1979. The primary structure of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 254:9839-9845.
- Jungehulsing, U., C.Arntz, R.Smit, and P.Tudzynski. 1994b. The *Claviceps purpurea* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene: cloning, characterization, and use for the improvement of a dominant selection system. *Curr. Genet.* 25:101-106.
- Kim, J.W. and C.V.Dang. 2005a. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 30:142-150.
- Kumar, S., K.Tamura, and M.Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5:150-163.
- Kuo, C.Y., S.Y.Chou, and C.T.Huang. 2004. Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and use of the *gpd* promoter for transformation in *Flammulina velutipes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:593-599.
- Larsen, G.G., K.F.Appel, A.M.Wolff, J.Nielsen, and J.Arnau. 2004c. Characterisation of the *Mucor circinelloides* regulated promoter *gpd1P*. *Curr. Genet.* 45:225-234.
- Memelink, J., K.M.M.Swords, L.A.Staehelin, and J.H.C. Hoge. 1994. Southern, Northern and Western blot analysis. *Plant Molecular Biology Manual*. 1-23. Kluwer Academic Publishers. Printed in Belgium.
- Mitsuzawa, H., M.Kimura, E.Kanda, and A.Ishihama. 2005. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and actin associate with RNA polymerase II and interact with its Rpb7 subunit. *FEBS Lett.* 579:48-52.
- Mogensen, J., H.B.Nielsen, G.Hofmann, and J.Nielsen. 2006b. Transcription analysis using high-density micro-arrays of *Aspergillus nidulans* wild-type

and creA mutant during growth on glucose or ethanol. *Fungal. Genet. Biol.* 43:593-603.

- Nakazato, L., V.Dutra, L.Broetto, C.C.Staats, M.H.Vainstein, and A.Schrank. 2006. Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef-1alpha* homologous promoter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:521-528.
- Pachlinger, R., R.Mitterbauer, G.Adam, and J.Strauss. 2005. Metabolically independent and accurately adjustable *Aspergillus* sp. expression system. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:672-678.
- Punt, P.J., M.A.Dingemanse, B.J.Jacobs-Meijnsing, P.H.Pouwels, and C.A.van den Hondel. 1988. Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* 69:49-57.
- Punt, P.J., C.Kramer, A.Kuyvenhoven, P.H.Pouwels, and C.A.van den Hondel. 1992. An upstream activating sequence from the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene. *Gene* 120:67-73.
- Puyesky, M., P.Ponce-Noyola, B.A.Horwitz, and A.Herrera-Estrella. 1997. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in *Trichoderma harzianum* is repressed during conidiation and mycoparasitism. *Microbiology* 143 (Pt 10):3157-3164.
- Ridder, R. and H.D.Osiewacz. 1992. Sequence analysis of the gene coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) of *Podospora anserina*: use of homologous regulatory sequences to improve transformation efficiency. *Curr. Genet.* 21:207-213.
- Rosato Y.B., Messias C.L. and Azevedo J.L. 1981. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 38: 1-3.
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Screen, S., A.Bailey, K.Charnley, R.Cooper, and J.Clarkson. 1997. Carbon regulation of the cuticle-degrading enzyme PR1 from *Metarhizium anisopliae* may involve a trans-acting DNA-binding protein CRR1, a functional equivalent of the *Aspergillus nidulans* CREA protein. *Curr. Genet.* 31:511-518.

- Shinohara, M.L., J.J.Loros, and J.C.Dunlap. 1998b. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is regulated on a daily basis by the circadian clock. *J. Biol. Chem.* 273:446-452.
- Sioud, M. and L.Jespersen. 1996. Enhancement of hammerhead ribozyme catalysis by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 257:775-789.
- Sirover, M.A. 1996. Minireview. Emerging new functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *Life Sci.* 58:2271-2277.
- Sirover, M.A. 1997. Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology. *J. Cell Biochem.* 66:133-140.
- Sirover, M.A. 1999a. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1432:159-184.
- Sundararaj, K.P., R.E.Wood, S.Ponnusamy, A.M.Salas, Z.Szulc, A.Bielawska, L.M.Obeid, Y.A.Hannun, and B.Ogretmen. 2004. Rapid shortening of telomere length in response to ceramide involves the inhibition of telomere binding activity of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 279:6152-6162.
- Templeton, M.D., E.H.Rikkerink, S.L.Solon, and R.N.Crowhurst. 1992. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene* 122:225-230.
- Thompson, J.D., T.J.Gibson, F.Plewniak, F.Jeanmougin, and D.G.Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-4882.
- Varma, A. and K.J.Kwon-Chung. 1999. Characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene [correction of glyceraldehyde-3-phosphate gene] and the use of its promoter for heterologous expression in *Cryptococcus neoformans*, a human pathogen. *Gene* 232:155-163.
- Verho, R., P.Richard, P.H.Jonson, L.Sundqvist, J.Londesborough, and M.Penttila. 2002. Identification of the first fungal NADP-GAPDH from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemistry* 41:13833-13838.

- Wang, C. and R.J.St Leger. 2006. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:6647-6652.
- Wolff, A.M. and J.Arnau. 2002. Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloides* (Syn. *racemosus*) and use of the *gpd1* promoter for recombinant protein production. *Fungal. Genet. Biol.* 35:21-29.
- Yan, H.Z. and R.F.Liou. 2006. Selection of internal control genes for real-time quantitative RT-PCR assays in the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*. *Fungal. Genet. Biol.* 43:430-438.
- Zheng, L., R.G.Roeder, and Y.Luo. 2003a. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* 114:255-266.