

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

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA GLICERALDEÍDO-3-
FOSFATO DESIDROGENASE NA SUPERFÍCIE CELULAR DO
ENTOMOPATÓGENO *Metarhizium anisopliae*.**

TESE DE DOUTORADO

LEONARDO BROETTO

Orientador: Dr. Augusto Schrank
Co Orientador: Dra. Marilene Henning Vainstein

Setembro, 2010

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

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

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA GLICERALDEÍDO-3-
FOSFATO DESIDROGENASE NA SUPERFÍCIE CELULAR DO
ENTOMOPATÓGENO *Metarhizium anisopliae*.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

LEONARDO BROETTO

Biólogo / UFRGS

Mestre em Biologia Celular e Molecular/UFRGS

Orientador: Dr. Augusto Schrank

Co Orientador: Dra. Marilene Henning Vainstein

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Agradecimentos

Ao Professor Augusto Schrank pela orientação e ensinamentos em todos esses anos de pesquisa no seu laboratório e pela confiança e oportunidade depositados em mim.

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

À Professora Irene Schrank por toda a ajuda a minha formação acadêmica e por todos os ensinamentos.

À todos os professor do Centro de Biotecnologia que ajudaram na minha formação acadêmica, em especial aos Professor Arnaldo Zaha, Henrique Bunselmeyer e Célia Carlini.

À Professora Célia Maria de Almeida Soares e ao Professor Alexandre Bailão pelos ensinamentos e auxílio.

A todos os colegas do Centro de Biotecnologia, em especial aos dos laboratórios 217, 220 e 222, que me ajudaram em todo esse trajeto.

À todos os funcionários do Centro de Biotecnologia, em especial à Silvinha, ao Seu Milton e ao Luciano.

À minha namorada e ao meu grande amor Melissa Fontes Landell, por todo o amor incondicional e por ter cuidado tanto de mim. Seu auxílio emocional assim como seu conhecimento acadêmico foram de extrema importância em minha formação. Só posso dizer que tenho a maior sorte do mundo por ter cruzado o seu caminho.

À meu Pai, minha Mãe e ao meu irmão, sem os quais eu nunca teria chegado aqui e de onde veio toda a minha inspiração e vontade de sempre aprender e melhorar mais.

À minha Nona, Wolsida Hermínia Fusari Broetto, que deixou muitas saudades a todos que tiveram o privilégio de conviver ao seu lado. Seus ensinamentos e a coragem com que enfrentou a vida são exemplos a serem seguidos por todos nós.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	VI
RELAÇÃO DE TABELAS.....	IX
RELAÇÃO DE FIGURAS.....	X
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIV
1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Proteínas multifuncionais	3
2.1.1 Proteínas multifuncionais em leveduras	16
2.1.2 A evolução das proteínas multifuncionais.....	20
2.1.3 A enzima multifuncional gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	26
2.2 O agente bio-controlador <i>Metarhizium anisopliae</i>	49
2.3 O processo de infecção de <i>Metarhizium anisopliae</i>	52
3. OBJETIVOS.....	59
3.1 Objetivo geral	59
3.2 Objetivos específicos	59
4. METODOLOGIAS.....	60
4.1.2. Microrganismos utilizados.....	60
4.1.3. Manutenção da linhagem E6 de <i>M. anisopliae</i>	60
4.1.4. Suspensão de conídios e produção de outros tipos celulares.....	60
4.1.5. Preparação de células eletro-competentes	61
4.1.7. Manipulação de ácidos nucleicos	62
4.1.8 Alinhamento de sequências e análise filogenética.....	63
4.1.9 Extração de RNA e análise por <i>Northern blot</i>	63
4.1.10 Extração de proteínas miceliais totais	65
4.1.11 Manipulação de proteínas: eletroforese e análise por <i>Western blot</i>	65
4.2.1 Determinação da sequência de resíduos de aminoácidos da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.....	67
4.2.2 Detecção da proteína GAPDH por microscopia de fluorescência e microscopia confocal	67
4.2.3 Atividade enzimática e fluorescência de conídios imunomarcados com GAPDH.....	69
4.3 Ensaio de adesão.....	70
4.4.1 Expressão heteróloga de GAPDH.....	70
4.4.2 Produção de anti-soro	72
5. RESULTADOS.....	73
5.1 Clonagem molecular e análise do gene <i>gpdh1</i> de <i>M. anisopliae</i>	73
5.2 Identificação da proteína GAPDH de <i>M. anisopliae</i>	78
5.3 Regulação fisiológica do gene <i>gpdh1</i> e da proteína cognata de <i>M. anisopliae</i>	81
5.4 Produção e purificação da proteína GAPDH recombinante	84

5.5 Geração de anti-soro em camundongos.....	86
5.6 <i>Western blot</i> de extratos de proteínas de superfície de conídios	87
5.7 Atividade da proteína GAPDH de extratos de superfície de conídios de <i>M. anisopliae</i>	89
5.8 Localização da proteína GAPDH na superfície celular	90
5.9 Inibição da adesão de conídios de <i>M. anisopliae</i> em asas de inseto pela ação da proteína GAPDH recombinante e pelo anti-soro anti-GAPDH	106
6. DISCUSSÃO	108
7. CONCLUSÕES	119
8. PERSPECTIVAS.....	121
9. REFERÊNCIAS.....	122
ANEXO 1 – Artigo: <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae: cell surface localization and role on host adhesion</i>	137
ANEXO2 – Currículo Lattes	153
ANEXO3 – Soluções e meios de cultivo.....	157

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

% por cento

BSA albumina sérica bovina

cDNA DNA complementar

Conídios.mL⁻¹ conídios por mililitro

C-terminal Carbóxi-terminal

DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole

dCTP dideoxicitosina

DEPC dimetilpirocarbonato

DMSO dimetilsulfóxido

DNA ácido desoxirribonucléico

dNTP dideoxynucleotídeo

DO densidade óptica

EDTA sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético

EST *Expressed Sequence Tags* (etiquetas de seqüências expressas)

FITC isotiocianato de fluoresceína

gpdh1 gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GAPDH proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

h hora

IPTG isopropiltiogalato

ITS *Internal Transcribed Spacer* (espaçador interno transcrito)

kb kilobase

kDa kilo Dalton

M molar

m/V massa por volume

MC meio de Cove

MCc meio de Cove completo

MEV microscopia eletrônica de varredura

MET microscopia eletrônica de transmissão

mg.mL⁻¹ miligrama por mililitro

mL mililitro

mM mili Molar

mRNA RNA mensageiro

ms milissegundo

MS/MS Espectrometria de massas com análise em tandem

N normal

ng nanogramas

nt nucleotídeo

N-terminal Amino-terminal

°C graus Celsius

ORF *Open Reading Frame* (fase aberta de leitura)

P³² isótopo radioativo 32 do elemento fósforo

pb pares de base

PCR *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

pH potencial de hidrogênio

pI ponto isoelétrico

RNA ácido ribonucléico

RPM rotações por minuto

RT-PCR *Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa)

uORF *upstream Open Reading Frame* (fase aberta de leitura à montante)

UTR *Untranslated Region* (região não-traduzida)

UV ultravioleta

v volts

v.cm⁻¹ volts por centímetro

V/V volume por volume

WT *Wild Type* (tipo selvagem)

µg micrograma

µg.mL⁻¹ micrograma por mililitro

µL microlitro

µm micrômetro

µM micromolar

µCi micro Curie

µmol micromol

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas multifuncionais.....	13
Tabela 2. Identidade e similaridade entre ortólogos de GAPDH	76
Tabela 3. Sequência de resíduos de aminoácidos de peptídeos internos correspondendo à proteína GAPDH de <i>M. anisopliae</i>	80

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1. Glicólise	28
FIGURA 2. GAPDH em associação com citoesqueleto e com o transporte vesicular	33
FIGURA 3. GAPDH nas mitocôndrias.....	41
FIGURA 4. Processo de infecção de <i>M. anisopliae</i> no hospedeiro	55
FIGURA 5. Número de cópias do gene <i>gpdh1</i>	73
FIGURA 6. Sequência e esquema do gene <i>gpdh1</i>	75
FIGURA 7. Árvore filogenética de ortólogos de GAPDH	77
FIGURA 8. Caracterização de isoformas de GAPDH de <i>M. anisopliae</i>	78
FIGURA 9. Cobertura dos peptídeos identificados na sequência predita de resíduos de aminoácidos de GAPDH de <i>M. anisoplie</i>	79
FIGURA 10. Padrão de expressão da proteína GAPDH durante o desenvolvimento de <i>M. anisopliae</i> em condições fisiológicas	82
FIGURA 11. Padrão de expressão dos transcritos de <i>gpdh1</i> de <i>M. anisopliae</i>	83
FIGURA 12. Expressão heteróloga de GAPDH em <i>E. coli</i>	85
FIGURA 13. Titulação do anti-soro contra GAPDH de <i>M. anisopliae</i>	86
FIGURA 14. Análise da presença de GAPDH em extratos de proteínas da superfície celular de conídios.....	88
FIGURA 15. Detecção da proteína GAPDH em conídios.	90
FIGURA 16 Localização da proteína GAPDH em conídios e apressórios de <i>M. anisopliae</i>	92
FIGURA 17. Localização da proteína GAPDH em micélio e blastosporos de <i>M. anisopliae</i>	93

FIGURA 18. Localização da proteína GAPDH em blastosporos germinados e em blastosporos germinados tardios de <i>M. anisopliae</i>	94
FIGURA 19. Localização da proteína GAPDH em blastosporos germinados tardios de <i>M. anisopliae</i>	95
FIGURA 20. Localização da proteína GAPDH em conídios de <i>M. anisopliae</i> utilizando microscopia confocal	96
FIGURA 21. Localização da proteína GAPDH por imunofluorescência confocal em conídios de <i>M. anisopliae</i>	97
FIGURA 22. Localização da proteína GAPDH por imunofluorescência confocal em conídios germinados de <i>M. anisopliae</i>	98
FIGURA 23. Localização da proteína GAPDH por imunofluorescência confocal em conídios germinados de <i>M. anisopliae</i>	99
FIGURA 24. Localização da proteína GAPDH por imunofluorescência confocal em apressórios de <i>M. anisopliae</i>	100
FIGURA 25. Localização da proteína GAPDH por imunofluorescência confocal em apressórios de <i>M. anisopliae</i>	101
FIGURA 26. Localização da proteína GAPDH por imunofluorescência confocal em micélio de <i>M. anisopliae</i>	102
FIGURA 27. Localização da proteína GAPDH por imunofluorescência confocal em blastosporos de <i>M. anisopliae</i>	103
FIGURA 28. Localização da proteína GAPDH por imunofluorescência confocal em blastosporos de <i>M. anisopliae</i>	104
FIGURA 29. Localização da proteína GAPDH por imunofluorescência confocal em blastosporos germinados de <i>M. anisopliae</i>	105

FIGURA 30. Ensaio de adesão de conídios de <i>M. anisopliae</i> em asas de <i>Dysdercus peruvianus</i> mostrando a participação da proteína GAPDH	107
FIGURA 31. Ensaio de adesão de conídios de <i>M. anisopliae</i> contra asas de <i>D. peruvianus</i>.....	107

Resumo

A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma enzima 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, sendo também capaz de catalisar a reação inversa. A enzima é um homotetrâmero, tendo monômeros com massa de 36 kDa. Além desta atividade, a proteína pode ainda desempenhar outras funções importantes em vários processos celulares. A partir da descrição da expressão diferencial do gene *gpdh1* (GAPDH) do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em condições que mimetizam a infecção, desenvolvemos este estudo para caracterizar a sua possível participação em outros processos celulares. Diversas análises foram realizadas para caracterizar o gene *gpdh1* e sua proteína cognata. Os padrões de expressão, tanto em nível transcricional como em nível protéico foram avaliados sob condições de regulação fisiológica, evidenciando um padrão de regulação hierárquico em resposta às diferentes fontes de carbono adicionadas a culturas do fungo. Utilizando 2D-SDS-PAGE, anti-soro anti GAPDH e espectrometria de massas, identificamos isoformas de GAPDH sendo expressas pelo fungo, sendo uma majoritária. Com base nos relatos encontrados na literatura de localização da proteína GAPDH na superfície celular de diferentes patógenos, direcionamos o trabalho no sentido de verificar a localização sub-celular da GAPDH em *Metarhizium*. Utilizando técnicas de imuno-microscopia, mostramos a localização na superfície celular dos

diferentes estágios de desenvolvimento do fungo. Mostramos também que a GAPDH localizada na superfície celular mantém a sua atividade enzimática. Utilizando ensaios de adesão de conídios de *M. anisopliae* em asas de insetos (*Dysdercus peruvianus*), mostramos que a GAPDH pode desempenhar uma função importante no processo de adesão do fungo na superfície do hospedeiro. Este trabalho descreve pela primeira vez a presença de isoformas de GAPDH, a sua localização na superfície celular e sua possível participação na adesão ao hospedeiro.

Abstract

GAPDH is essential in glycolysis and gluconeogenesis pathways and catalyzes the oxidative phosphorylation of glyceraldehyde-3-phosphate into 1,3-biphosphoglycerate in the presence of nicotinamide adenine nucleotide (NAD⁺) and inorganic phosphate, as well as the reverse reaction. The enzyme is an homotetramer of 36 kDa subunits. GAPDH has other important roles in various cellular processes. The gene *gpdh1* (GAPDH) was found to display differential expression during growth of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* cultured in conditions mimicking host infection. This led us to search for other possible functions of the GAPDH in the fungus. Therefore, we characterized the expression patterns of GAPDH, both at the transcription and protein level; we characterized isoforms of the protein; we immunolocalized GAPDH in different cell types and assayed its participation in adhesion to host surface. The expression of transcripts and GAPDH is hierarchily regulated by the carbon source available in the cultures (glucose, glycerol, ethanol and complex substrates, such as chitin and cuticle). By using 2D-SDS-PAGE, anti-GAPDH serum and mass spectrometry, isoforms of the protein were detected. As GAPDH has been reported at cell surface of pathogenic microorganisms, we directed efforts to localize GAPDH in *Metarhizium*. By using immunomicroscopy we showed the presence of GAPDH at the surface of the different developmental cell types of the fungus. We have also shown that the GAPDH at cell surface has enzyme activity. In adhesion assays, using *Metarhizium* conidia and insect wings (*Dysdercus peruvianus*), we showed that the GAPDH may be important during the adhesion step of the fungus to the host during infection. In this work, for the first time, we show that GAPDH from *Metarhizium anisopliae*

has isoforms; that the active GAPDH is present at the fungal cell surface and is probably important for fungal to host adhesion.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o conceito de uma proteína com uma única função vem sendo substituído em pelo acúmulo de dados sobre proteínas que apresentam mais de um papel. Devido as suas características multifuncionais, estas proteínas são conhecidas como proteínas *moonlighting* (termo cunhado por Constance Jeffery em 1999), as quais por natureza, apresentam pelo menos duas funções diferentes em apenas uma única sequência de resíduos de aminoácidos (Jeffery, 1999, Wolff & Arnau, 2002, Larsen, *et al.*, 2004).

O processo de infecção do fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae* em seus hospedeiros artrópodes está bem descrito e é um dos principais focos de investigação deste sistema patógeno-hospedeiro. Durante a procura por sequências de *M. anisopliae* expressas diferencialmente no processo de infecção, um gene com identidade à gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH 1.2.1.12) de ortólogos intimamente relacionados à *M. anisopliae* foi identificado e apresentou regulação positiva de sua expressão (Dutra, *et al.*, 2004). A identificação do gene como pertencente a um grupo de sequências positivamente expressas foi recebido com surpresa e desconfiança frente à literatura majoritariamente disponível no momento da identificação. Popularmente caracterizada como uma enzima ou gene *housekeeping* (ou de manutenção), a proteína GAPDH sempre foi conhecida pelo seu emprego como controle no estudo da expressão de genes regulados devido ao seu padrão de expressão considerada constitutiva. Da mesma forma, o uso da sequência regulatória promotora do gene para dirigir a expressão homóloga e

heteróloga de proteínas sempre encontrou justificativa no forte padrão de expressão emprestado a toda fase de leitura mantida sob a sua regulação.

Entretanto, um número reduzido de trabalhos atribuía, na época em que a sequência relativa a GAPDH foi identificada em *Metarhizium* a partir de análise diferencial por Dutra *et al.*, (2004), à proteína GAPDH outras funções e localizações até então não identificadas. Com o avanço dos estudos, a característica multifuncional da proteína mostrou-se merecedora de um extenso número de publicações. Um grande número de artigos científicos classifica a proteína GAPDH como uma proteína *moonlighting*, ou seja, uma proteína multifuncional ou que apresenta outras funções que aquelas “tradicionalmente” descritas. 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. Assim, neste trabalho estudamos características de regulação do gene codificando GAPDH de *M. anisopliae*, bem como características da proteína.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Proteínas multifuncionais

Com o desenvolvimento da era genômica, a partir de meados da década de 90, um grande número de sequências de genes tornou-se rapidamente disponível. O próximo grande “gargalo” a frente da corrida genômica, e que até a atualidade é enfrentado com dificuldade, é a determinação da função das proteínas codificadas e também como todas as proteínas codificadas no genoma “orquestram” a complexidade de uma célula viva.

Muitas das funções das proteínas podem ser inferidas a partir de funções já conhecidas de proteínas ortólogas. Entretanto, a existência de proteínas multifuncionais torna a interpretação complexa, mas, sobretudo, nos coloca em contato com uma fascinante complexidade de interações entre os vários componentes que regem o funcionamento dos sistemas. A classe de proteínas multifuncionais não inclui proteínas cujas diversas funções são o resultado da fusão de genes, famílias de proteínas homólogas, derivações por variação no *splicing* ou atividade promíscua de enzimas. A classe também não inclui proteínas que têm a mesma função em diferentes tipos celulares ou em diferentes sub localizações celulares.

Os primeiros exemplos de proteínas multifuncionais foram descritos no final da década de 80, quando Piatigorsky e Wiston (Piatigorsky & Wistow, 1989) observaram que certas proteínas estruturais encontradas no cristalino dos olhos de vertebrados, conhecidas como cristalinas, eram na verdade proteínas conhecidas por possuírem outras funções previamente descritas. Por

exemplo, a proteína encontrada nos patos, ϵ -cristalina, foi identificada como uma lactato desidrogenase (Hendriks, *et al.*, 1988), enquanto a proteína τ -cristalina de tartarugas é também a enzima glicolítica α -enolase. O papel metabólico dessas enzimas no cristalino, onde elas se acumulam em altas concentrações, é desconhecido (Wistow, *et al.*, 1988). Mas a observação mais importante é de que algumas proteínas cristalinas são parálogos enzimaticamente inativos dessas enzimas. Para descrever o fenômeno da multifuncionalidade, Piatigorsky inicialmente convencionou chamar o mesmo de compartilhamento gênico, que hoje, como já mencionado acima, é conhecido pelo nome de *moonlighting*, em analogia às pessoas que possuem múltiplos empregos. As proteínas multifuncionais são muito especiais por terem a capacidade de executar funções autônomas, frequentemente não relacionadas, e que não são particionadas em diferentes domínios da proteína. Portanto, proteínas que possuem múltiplas funções como resultado de fusão gênica são excluídas. O mesmo é verdade para proteínas que são resultado de diferentes variantes de *splicing* do mesmo gene. Outro critério importante utilizado na caracterização de proteínas multifuncionais é a independência das funções, onde a inativação de uma das funções, por mutação, por exemplo, não afetaria a função secundária e vice-versa. A multifuncionalidade das proteínas não pode ser confundida com efeitos pleiotrópicos, os quais geralmente resultam da inativação de uma única função envolvida em múltiplos processos celulares, por exemplo, proteínas que interagem com múltiplos componentes em diferentes rotas, ou ainda uma enzima que é importante em diferentes vias metabólicas. Ao contrário disto, as proteínas multifuncionais executam múltiplas funções, as quais diferem mecanisticamente umas das outras.

Outras proteínas multifuncionais foram encontradas com envolvimento em funções celulares e rotas bioquímicas importantes para o câncer e para outras doenças, assim como em funções fisiológicas básicas como na mobilidade celular, na angiogênese, no transporte transmembrana, na síntese ou reparo de DNA, na estrutura da cromatina e do citoesqueleto e no metabolismo de proteínas, aminoácidos, sacarídeos e lipídeos (Gurney, *et al.*, 1986, Gurney, *et al.*, 1986, Faik, *et al.*, 1988). Um maior conhecimento sobre esta classe de proteínas multifuncionais pode ajudar a compreender quais tipos de proteínas poderiam apresentar uma segunda função, sendo útil na determinação da função de milhares de proteínas identificadas nos genomas sequenciados. Esta determinação pode ser importante também na seleção de proteínas alvo para o desenvolvimento de drogas; por exemplo, em casos aonde seria necessário inibir apenas umas das funções de uma proteína multifuncional, pois a perda de uma função primária poderia levar à toxicidade.

A função das proteínas pode variar como consequência da alteração na sua localização celular, no tipo celular, no estado oligomérico ou na concentração celular de um ligante, substrato, cofator ou produto. Estes diferentes mecanismos não são mutuamente exclusivos e, em muitos casos, a proteína pode utilizar uma combinação de métodos para alternar entre as suas diferentes funções. A mesma proteína pode executar duas diferentes funções em diferentes locais dentro da célula. A proteína PutA de *Escherichia coli*, por exemplo, possui atividade de prolina desidrogenase e atividade de pirrolina-5-carboxilato desidrogenase quando está associada à membrana plasmática, mas não possui atividade enzimática e liga-se a DNA como um repressor

transcricional quando presente no citoplasma (Ostrovsky de Spicer & Maloy, 1993, Muro-Pastor, *et al.*, 1997).

Outras proteínas podem apresentar uma função no interior da célula e outra função no espaço extracelular. A fosfoglicose isomerase é uma enzima citosólica ubíqua que catalisa o segundo passo da via glicolítica, a interconversão de glicose 6-fosfato em frutose 6-fosfato. Entretanto, a proteína também é secretada e possui pelo menos outras quatro funções adicionais; incluindo atividade de neuroleucina (Chaput, *et al.*, 1988, Faik, *et al.*, 1988), que, na verdade, possui duas outras funções: é uma citocina que causa maturação de células B em células secretoras de anticorpos (Gurney, *et al.*, 1986) e um fator de crescimento do sistema nervoso que promove a sobrevivência de alguns neurônios embrionários e alguns nervos sensoriais (Gurney, *et al.*, 1986). Em adição a estas funções, a fosfoglicose isomerase/neuroleucina, é a mesma proteína possuindo função de um fator de motilidade autócrino (AMF), uma citocina que estimula a migração celular (Watanabe, *et al.*, 1996). Finalmente, a proteína é também um mediador da diferenciação e da maturação que pode causar a diferenciação de algumas células em células mielóides leucêmicas.

A timidina fosforilase também possui funções diferentes dentro e fora da célula (Furukawa, *et al.*, 1992). No citoplasma, ela catalisa a desfosforilação da timidina, desoxiuridina e seus análogos à suas bases e 2-desoxiribose 1-fosfato. No fluido extracelular, ela é um fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas, que estimula o crescimento de células endoteliais e estimula a quimiotaxia.

Uma mesma proteína pode também possuir diferentes funções quando é expressa em diferentes tipos celulares. A neuropilina, por exemplo, é um receptor de superfície celular em células endoteliais que detecta fatores de crescimento vasculares endoteliais indicando quando novas células sanguíneas são necessárias (Soker, *et al.*, 1998). Nos axônios de nervos, ela é novamente um receptor de superfície celular mas detecta um ligante diferente, semaforina III, ajudando a direcionar os axônios para seus destinos.

Algumas proteínas apresentam uma atividade enzimática como monômero e outras como multímero. A subunidade de 37 kDa da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase humana, por exemplo, é uma enzima glicolítica que, como tetrâmero converte gliceraldeído-3-fosfato à 1,3-difosfoglicerato. Como um monômero, ela é uma uracil-DNA glicosilase nuclear (Meyer-Siegler, *et al.*, 1991). Esta atividade é importante para remover uracil que está presente no DNA devido ao uso acidental de desoxi UTP durante a síntese de DNA ou deaminação de resíduos de citosina.

A função de uma determinada enzima pode ser alterada pela quantidade de substrato, ligante ou cofator disponível. A proteína PutA mencionada anteriormente liga-se à membrana quando a concentração do substrato (prolina) é alta, mas liga-se à DNA quando as concentrações do substrato diminuem (Ostrovsky de Spicer & Maloy, 1993). O estado oligomérico da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (uracil-DNA glicosilase nuclear) é influenciado pela concentração de ATP celular, NAD^+ e da própria proteína. Aconitase é uma enzima dependente de ferro que possui atividade catalítica apenas quando as concentrações de ferro celular são altas. Quando as concentrações de ferro diminuem a proteína aconitase perde seu grupamento

4Fe-4S e sua atividade catalítica, ganhando um novo papel como elemento responsivo à ferro (IRE)-*binding protein* (IRE-BP) (Kennedy, *et al.*, 1992).

Algumas cadeias polipeptídicas de proteínas multifuncionais formam subunidades que podem possuir funções alternativas. A enzima carbinolamina desidratase é um exemplo. Ela é uma enzima importante no metabolismo do fígado, convertendo 4 α -hidroxitetraidobiopterina à dihidrobiopterina quinonóide, e é também cofator de dimerização DCoH, o qual regula a atividade DNA ligante do fator de transcrição HNF-1 α (fator nuclear hepático 1 α). Outro exemplo interessante é a proteína tioredoxina de *Escherichia coli*, a qual é importante na síntese de desoxiribonucleotídeos (auxilia na redução de ribonucleosídeo difosfato a desoxiribonucleotídeo difosfato). Essa mesma proteína é recrutada pelo fago T7 onde desempenha função como subunidade de uma DNA polimerase heterodimérica (Mark & Richardson, 1976).

Algumas proteínas têm uma atividade e em adição servem como reguladoras de proteínas com atividade semelhante. O regulador de condutância-transmembrana da fibrose cística é tanto um canal de cloreto dependente de AMP cíclico, como também um regulador de um canal de sódio epitelial (Hardy, *et al.*, 1995). De forma semelhante, o transportador transmembrana glicoproteína-P de resistência a múltiplas drogas regula canais iônicos que respondem ao turgor celular (Luckie, *et al.*, 1994).

Algumas enzimas biosintéticas ou catabólicas regulam sua própria transcrição frente à disponibilidade da enzima, do substrato ou do produto presente. Timidilato sintase, por exemplo, se liga uma alça da proteína na região 5' não traduzida de seu próprio mRNA inibindo a tradução (Chu, *et al.*, 1991). A proteína PutA apresenta a propriedade de detectar quando a

concentração do substrato utilizado por ela é limitante e de prevenir a transcrição do gene *putA*. O produto do gene *birA* de *E. coli* é uma biotina-holoenzima sintase, que sintetiza biotinila-5'-adenilato, quando há biotinila-5'-adenilato suficiente no citoplasma, a proteína funciona como um repressor do operon Bio (Barker & Campbell, 1981).

A proteína ARGONAUTA4 (AGO4) apresenta duas funções separadas na metilação RNA-dirigida de DNA (Qi, *et al.*, 2006). A sua função mais conhecida é como uma enzima que cliva moléculas de RNA para produzir siRNA, entretanto, ela possui uma função secundária não catalítica pouco conhecida de dirigir o remodelamento da cromatina em locus específicos. A afirmação de que as duas funções são independentes é suportada pela observação que mutações em resíduos de aminoácidos do sítio catalítico resultam em uma proteína sem atividade hidrolítica que, entretanto, não apresenta perda de sua atividade não catalítica.

Na bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, uma nova função na evasão do sistema imune e na invasão do tecido do hospedeiro foi descoberta para o fator de alongamento da tradução *tuf* (Kunert, *et al.*, 2007). No citosol, *tuf* desempenha sua função primária como fator de alongamento de cadeia, entretanto, a proteína é também encontrada na superfície da célula onde funciona como receptor para duas proteínas plasmáticas do hospedeiro, fator H e plasminogênio, as quais são usadas para subverter o sistema, através da evasão do sistema imune e da invasão do tecido, respectivamente. O fator H é um cofator plasmático da serino protease fator 1, o qual é necessário para degradação da proteína C3b do sistema complemento do hospedeiro. Desta forma o fator H evita a indução da ativação do sistema complemento, evitando

a destruição da bactéria. Quando *tuf* liga-se ao plasminogênio este é ativado à plasmina, que, por sua vez, auxilia na degradação da matriz extracelular do hospedeiro, o que permite a invasão do tecido e disseminação do patógeno.

Estudos recentes indicam que a proteína retinóide e hidroxí-esteróide desidrogenase/reductase, *hRoDH-E2*, também desempenha no núcleo a função de repressor transcricional (Markova, *et al.*, 2006). *hRoDH-E2* regula negativamente a atividade do promotor da região cis que interage afetando a quantidade de acetilação e desacetilação de histonas próximas ao sítio de início da transcrição, possivelmente agindo no recrutamento ou atividade de histonas acetilases e desacetilases. A função de repressor transcricional independe da atividade de seu sítio ativo, uma vez que mutações dirigidas nesta mesma região da proteína geram proteínas que mantêm sua capacidade em reprimir a atividade do promotor com o qual interagem.

Huang *et al.*, (2006) utilizaram mutagênese e ensaio de atividade para demonstrar que a proteína *La*, previamente descrita por efetuar diferentes atividades na maturação de tRNA, desempenha diferentes funções. O domínio em hélice de *La* liga-se a UUU-OH 3' do RNA protegendo a extremidade 3' do RNA da digestão. Outro domínio, RRM1, com domínios hélice e folhas beta também são necessários em uma segunda função de chaperona assistindo ao *folding* do RNA.

FdGOGAT é descrita como uma subunidade da enzima SQD1 (Shimojima, *et al.*, 2005). Em cloroplastos de espinafre, ela catalisa a transferência de sulfito para glicose-UDP na biosíntese do sulfolípídeo sulfoquinovosildiacilglicerol. FdGOGAT é considerada como uma enzima

multifuncional porque o seu cofator FMN (flavina mononucleotídeo) liga-se a sulfito e pode possivelmente ser a fonte de sulfito para a enzima SQD1.

Uma função adicional foi encontrada por Chen *et al.*, (2005) para a proteína mitocondrial do ciclo do ácido cítrico, a aconitase. Os autores encontram a aconitase no nucleóide compondo um complexo proteína-DNA que contem DNA mitocondrial e é essencial para a manutenção do mtDNA sob certas condições de crescimento. Eles demonstraram que mutações em uma cisteína que coordena o grupamento ferro-enxofre (4Fe-4S), o qual é um cofator necessário para a função catalítica da enzima, não afetam a nova função atribuída a ela. Sendo assim, a atividade catalítica não é necessária para a função adicional da enzima. Os autores propõem que a utilização da aconitase pelo sistema poderia ajudar a célula a coordenar alguns sinais metabólicos à manutenção do mtDNA, e que talvez os nucleóides de mtDNA poderiam assumir múltiplos estados que dependeriam das condições metabólicas da célula. A aconitase ajudaria coordenando sinais metabólicos à manutenção do mtDNA em células não reprimidas, e que outra proteína, Abf2p, poderia ser importante para a manutenção do mtDNA em células reprimidas por glicose.

A enzima enolase catalisa a desidratação do 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. Entelis e coautores (Entelis, *et al.*, 2006) observaram que a proteína auxiliaria na importação de tRNAs^{Lys} para a mitocôndria ajudando na formação de um complexo preMsk1p-tRNA. A enolase parece participar na formação do complexo sem fazer parte do mesmo. Os autores sugerem que a enolase teria a função de uma chaperona com atuação nas moléculas de RNA, e que auxiliaria os RNAs a obterem a conformação correta para interação com

suas proteínas alvo, ou atuariam estabilizando a conformação do RNA. Mutações afetando a função catalítica da enolase não afetaram sua função secundária.

Abaixo segue uma tabela com alguns exemplos de proteínas multifuncionais (Tabela 1).

Tabela 1. Proteínas multifuncionais

Nome	Função primária	Função secundária	Referência
PutA	Prolina desidrogenase.	Repressor transcricional.	(Ostrovsky de Spicer & Maloy, 1993, Muro-Pastor, <i>et al.</i> , 1997).
ARGONAUTA4	Cliva transcritos de RNA para produzir siRNAs.	Direciona fatores de remodelamento da cromatina para locus alvo.	(Qi, <i>et al.</i> , 2006).
Ubp6	Desubiquitinação de cisteíno proteases.	Atrasa a degradação de proteínas ubiquitinadas pelo proteassoma.	(Hanna, <i>et al.</i> , 2006).
Fosfoglicose isomerase	Enzima glicolítica.	Neuroleucina, autócrino fator de motilidade, mediador de diferenciação e maturação.	(Chaput, <i>et al.</i> , 1988, Xu, <i>et al.</i> , 1996).
Tuf	Fator de alongamento da tradução.	Receptor para proteínas do hospedeiro.	(Kunert, <i>et al.</i> , 2007).
Timidina fosforilase	Desfosforilação da timidina.	Fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas.	(Furukawa, <i>et al.</i> , 1992).
hRoDH-E2	Desidrogenase / redutase.	Repressor transcricional.	(Markova, <i>et al.</i> , 2006).
Neuropilina	Receptor de superfície de células endoteliais.	Receptor para semaforina III.	(Soker, <i>et al.</i> , 1998).
Proteína La	Protege o RNA contra a digestão na extremidade 3'.	Chaperona de dobramento de RNA.	(Huang, <i>et al.</i> , 2006).
Aconitase	Enzima ferro dependente	Elemento ferro responsivo que atua em sequências regulatórias	(Kennedy, <i>et al.</i> , 1992, Basilion, <i>et al.</i> , 1994).
cPrxI	Peroxidase.	Chaperona.	(Jang, <i>et al.</i> , 2004).
Carbinolamina	Metabolismo da fenilalanina no	Co-fator de dimerização (DCoH)	(Citron, <i>et al.</i> , 1992).

desidratase	fígado.		
FdGOGAT	Glutamato sintase.	Subunidade da UDP-sulfoquinovose sintase.	(Shimajima, <i>et al.</i> , 2005).
<i>E. coli</i> tioredoxina	Síntese de desoxiribonucleotídeos.	Subunidade da DNA polimerase de T7.	(Mark & Richardson, 1976).
Aconitase mitocondrial	Enzima do ciclo do ácido cítrico.	Manutenção do mtDNA.	(Chen, <i>et al.</i> , 2005).
<i>E. coli</i> receptor de aspartato	Quimiotaxia.	Receptor maltose ligante.	(Wolff & Parkinson, 1988, Mowbray & Koshland, 1990).
Enolase	Enzima glicolítica.	Auxilia na importação mitocondrial tRNA ^{Lys} .	(Entelis, <i>et al.</i> , 2006).
PMS2	Enzima ubíquota de reparo de erros.	Hipermutação das cadeias dos anti-soros.	(Cascalho, <i>et al.</i> , 1998).
Arg5,6	Redutase / quinase.	DNA ligante.	(Hall, <i>et al.</i> , 2004).
Proteínas ribossômicas	Estrutura dos ribossomos.	Reparo de DNA, reguladores tradicionais, reguladores de desenvolvimento, etc.	(Wool, 1996).
Gpx4	Peroxidase.	Formação da cápsula mitocondrial durante a maturação do esperma.	(Freund, <i>et al.</i> , 2003, Scheerer, <i>et al.</i> , 2007)
Cristalinas dos olhos	Estrutura dos olhos.	Choque térmico, lactato desidrogenase, argininosucinato, retinaldeído desidrogenase, liase, enolase, quinona oxiredutase, GAPDH, etc.	(Piatigorsky, 1998).

U5-52K or CD2BP2	Proteína do spliceosome	Liga a receptores CD2.	(Nielsen, <i>et al.</i> , 2007).
CFTR	Canal de cloro dependente de AMP cíclico.	Regulador de outros canais aniônicos epiteliais.	(Stutts, <i>et al.</i> , 1995).
Pth2/Bit1	Peptidil-tRNA hidrolase 2.	Inibidor da transcrição.	(De Pereda, <i>et al.</i> , 2004).
Glicoproteína P	Transportador transmembrana de resistência a múltiplas drogas.	Regulador do turgor celular mediado por canais iônicos.	(Luckie, <i>et al.</i> , 1994, Hardy, <i>et al.</i> , 1995)
Trombino protease	Cliva fibrinogênio para produzir fibrina na cascata de coagulação.	Ligantes pra receptores de superfície celular.	(Vu, <i>et al.</i> , 1991).
Aconitase citoplasmática,	Aconitase.	Proteína mRNA ligante.	(Dupuy, <i>et al.</i> , 2006, Walden, <i>et al.</i> , 2006)
Timidilato sintase	Catalisa a metilação do desoxiuridilato em desoxitimidilato.	Inibidor da tradução.	(Chu, <i>et al.</i> , 1991)
Biotina sintase <i>birA</i>	Holoenzima biotina sintase.	Repressor do operon Bio.	(Barker & Campbell, 1981).
Protease mitocondrial LON	Protease dependente de ATP.	Chaperona.	(Piatigorsky, 1998).
FtsH	Auxilia o transporte de proteínas através da membrana.	Metaloprotease.	(Piatigorsky, 1998).
Endonuclease I-Tevl	Endonuclease endógena.	Autorepressor transcricional.	(Van Roey, <i>et al.</i> , 2001, Edgell, <i>et al.</i> , 2004).

2.1.1 Proteínas multifuncionais em leveduras

Embora as proteínas multifuncionais estejam presentes nos mais diferentes organismos, àquelas encontradas em eucariotos superiores ganharam mais atenção devido às implicações que a multifuncionalidade pode ter em degenerações de alguns genes cópia única, cujos sintomas ou fenótipo não podem ser correlacionados diretamente com o genótipo relevante. Entretanto, a facilidade da manipulação genética de alguns eucariotos inferiores, como as leveduras, acabou levando a um maior estudo das proteínas multifuncionais nestes microrganismos.

S. cerevisiae possui três enzimas fosforiladoras de glicose: duas hexoquinases e uma glucoquinase. Entretanto, durante o desenvolvimento da levedura em cultivo com glicose, a hexoquinase predominante é a hexoquinase 2 (Hxk2) e é por isso responsável pelo início do metabolismo intracelular da glicose (Herrero, *et al.*, 1995). A glicose leva à repressão da transcrição de um grande número de genes em leveduras através de um complexo processo conhecido como repressão por catabólito de carbono, no qual ocorre a interação de uma série de fatores e sinais (Gancedo, 1998, Carlson, 1999, Johnston, 1999, Belinchon & Gancedo, 2007). Mutantes de *S. cerevisiae* para *hvk2* apresentam a repressão por catabólito de alguns de seus genes, como *SUC2* e genes *GAL*, abolida (Zimmermann & Scheel, 1977).

Resultados demonstram que a proteína hexoquinase participa em circuitos de regulação em *S. cerevisiae*. Ensaio de atividade enzimática em núcleos isolados, *immunoblotting* e distribuição da proteína Hxk2 fusionada à GFP (*Green Fluorescent Protein*) demonstraram inequivocamente que, em

leveduras cultivadas em presença de 2 % a 4 % de glicose, cerca de 15 % da Hxk2 encontra-se localizada no núcleo (Herrero, *et al.*, 1998, Randez-Gil, *et al.*, 1998). Além disso, o peptídeo com dez resíduos de aminoácidos Lis⁶ – Met¹⁵ de Hxk2, dispensável para a atividade catalítica da enzima, é extremamente importante para a enzima pela sua localização nuclear e por mediar a repressão de *SUC2*, *HXK1* ou *GLK1* (Herrero, *et al.*, 1998, Rodriguez, *et al.*, 2001).

Foi demonstrada ainda a interação direta de Hxk2 com o repressor transcricional Mig1, uma proteína com motivo dedo de zinco C₂H₂ que se liga aos promotores de muitos genes que sofrem repressão quando o microrganismo se desenvolve em presença de glicose, ressaltando a importância do decapeptídeo Lis⁶ – Met¹⁵ de Hxk2 na interação (Ahuatzi, *et al.*, 2004). A ligação de Mig1 à Hxk2 é necessária para a retenção de Hxk2 no núcleo da célula, a qual apresenta padrão glicose dependente, o que pode ser explicado pela dependência de glicose para a localização nuclear de Mig1 (De Vit, *et al.*, 1997). Quando glicose está presente sob baixas concentrações ou está ausente, Mig1 é fosforilada pela forma ativa de Snf1, uma proteína necessária para desrepressão dos genes reprimidos por glicose, e sua fosforilação inibe a capacidade de repressão de Mig1 (Treitel, *et al.*, 1998, Smith, *et al.*, 1999). Uma vez fosforilada, Mig1 é exportada para o citosol, Hxk2 não entra no núcleo, e a repressão é liberada. Sob altas concentrações de glicose, Hxk2 e Mig1 interagem no núcleo, sugerindo que o papel de Hxk2 na repressão da assimilação glicose pode ser o de bloquear a fosforilação de Mig1, possivelmente pela ação da proteína quinase Snf1 ativa, Hxk2 e Mig1 são importantes também para evitar interferência de outras vias de sinalização.

Parece claro que a proteína Hxk2 exerce também a função de elemento do circuito regulatório da repressão por glicose de alguns genes em *S. cerevisiae*.

Betchet *et al.*, (1970), utilizando metodologia de mutagênese para o estudo da expressão de genes envolvidos com o metabolismo da arginina em *S. cerevisiae*, descreveram um mutante para o gene Arg82, que apresentava perda da capacidade repressora das enzimas da via de biossíntese da arginina, assim como ausência de indução da sua via de degradação. Análises posteriores do mutante demonstraram que a disrupção do gene é capaz de causar problemas para a célula como defeitos no desenvolvimento a 37 °C, esterilidade em *mating type MAT α* , fragmentação vacuolar, diminuição na transcrição de genes específicos de *MAT α* e *MAT α* e esporulação defectiva quando a disrupção foi homozigótica em diplóides (Dubois & Messenguy, 1994).

O vacúolo de leveduras é uma organela que participa em diversos processos celulares, tais como resposta ao estresse osmótico, *turnover* de proteínas, acumulação de aminoácidos, acumulação de polifosfatos ou de compostos tóxicos. Além disso, os vacúolos têm relação ativa com a maquinaria de tráfego vesicular (Klionsky, *et al.*, 1990). A fusão de vacúolos pode ser de dois tipos: homotípica, onde vesículas de mesma natureza são fundidas, e heterotípica, onde ocorre fusão entre vesículas de diferentes tipos. Durante um estudo *in vitro* utilizando vesículas homotípicas foi observado que um complexo citosólico de alta massa molecular era necessário para o processo. Investigações posteriores por fracionamento das proteínas envolvidas levaram à identificação de uma enolase como integrante do complexo (Decker & Wickner, 2006).

A enolase é uma enzima encontrada em abundância no citosol, onde catalisa a interconversão de 2-fosfoglicerato e fosfoenolpiruvato. Em *S. cerevisiae* há dois genes, *ENO1* e *ENO2*, que codificam duas enzimas com > 90 % de identidade (Martin, *et al.*, 1979). A adição de Eno1 e Eno2 recombinantes purificadas a uma reação de fusão vacuolar *in vitro* estimulou a fusão de maneira dose dependente, demonstrando que a enolase é realmente um estimulador, e não apenas um contaminante carregado com o fator de alto peso molecular. Mutantes de *S. cerevisiae* com o gene *ENO1* deletado e baixo nível de expressão de *ENO2*, apresentaram defeitos na estrutura dos vacúolos, exibindo vacúolos fragmentados. Estes vacúolos também apresentam baixos níveis de outras proteínas, sugerindo um papel da enolase no tráfego de proteínas (Decker & Wickner, 2006).

A variedade de proteínas e a diversidade de suas multifunções, representam o amplo espectro de diferentes processos nos quais as proteínas de leveduras originalmente identificadas como enzimas de metabolismo podem atuar. A situação em leveduras não difere muito da situação encontrada em eucariotos superiores (Sriram, *et al.*, 2005). O fato de que há um número maior de casos descritos em *S. cerevisiae* do que para outras espécies de leveduras, não significa necessariamente que nestas o fenômeno da multifuncionalidade de proteínas seja menos frequente. Provavelmente, esta diferença reflete tão somente o fato de que *S. cerevisiae* foi mais extensivamente estudado do que em outras espécies.

2.1.2 A evolução das proteínas multifuncionais

O fenômeno de multifuncionalidade das proteínas levanta duas grandes questões: (1) como as proteínas multifuncionais surgiram durante a evolução? e (2) como o fenômeno beneficia as células? (Jeffery, 1999). Várias enzimas multifuncionais são enzimas ubíquas, por exemplo, enzimas glicolíticas. As enzimas glicolíticas estão presentes em eucariotos, bactérias e archaea, e provavelmente fazem parte da maquinaria destas células há bilhões de anos, tempo suficiente para empregar tais enzimas em funções adicionais.

O gene PMS2 de rato codifica uma enzima de reparo de erro ubíqua que parece ter sido recrutada por alguns tipos de células sanguíneas para o uso em hipermutações somáticas de cadeias variáveis de anticorpos (Cascalho, *et al.*, 1998). Muitas proteínas do cristalino do olho e proteínas ribossômicas são idênticas às proteínas citoplasmáticas e foram aparentemente recrutadas durante a evolução do olho moderno e durante a evolução de ribossomos, respectivamente (Wool, 1996, Piatigorsky, 1998).

Existem diversos motivos pelos quais as proteínas multifuncionais poderiam beneficiar os organismos, resultando em uma vantagem competitiva durante a evolução. O mais simples, que poderia ser bem aplicado para procariotos, é o fato de que a disponibilidade de proteínas multifuncionais diminui o número de proteínas a serem sintetizadas pelo organismo, e conseqüentemente menos DNA para ser replicado, economizando uma grande quantidade de energia durante o crescimento e a reprodução (Jeffery, 1999). Apesar disto, a afirmação se torna pouco provável quando nos lembramos que, em muitos organismos, grandes partes de seus genomas parecem não ter uma

função, indicando que existiria pouca pressão seletiva para limitar o tamanho do genoma (Gregory, 2005).

Para o desenvolvimento de uma nova função de uma proteína multifuncional, parece haver algum tipo de compatibilidade inata da proteína para a sua nova função (Aharoni, *et al.*, 2005). Mutações que aumentam a habilidade da proteína em desenvolver sua nova função são subsequentemente selecionadas. Há indicação de que um número limitado de mutações é suficiente para introduzir uma nova função em uma proteína. Um bom exemplo é a proteína GroEL de *Enterobacter aerogenes*, uma bactéria que vive na saliva das larvas das formigas-leão (larva da família Myrmeleontidae que se alimenta de outros insetos e injeta uma toxina que paralisa suas presas produzida pela bactéria presente na saliva). Yoshida *et al.*, (2001) identificaram a toxina paralisante da saliva do inseto como um homólogo de GroEL, uma chaperona conhecida (Braig, *et al.*, 1994).

A proteína GroEL de *E. aerogenes* difere apenas em 11 aminoácidos da proteína GroEL de *E. coli* (Yoshida, *et al.*, 2001) e não é tóxica, enquanto a proteína de *E. aerogenes* é tóxica. A análise por mutação revelou que apenas quatro aminoácidos são essenciais para a mutação, e pelo fato de nenhum estar próximo de uma região estrutural importante para a proteína, não ocorre comprometimento da função de chaperona da proteína. De maneira muito interessante, uma variante tóxica da GroEL de *E. coli* pode ser construída pela introdução dos aminoácidos correspondentes na proteína. Neste exemplo, verifica-se que podem ser necessárias modificações em apenas quatro aminoácidos para introduzir uma nova função em uma proteína.

Estruturalmente, uma nova função de uma proteína pode ser o resultado de novos usos para um sítio de ligação existente ou ainda modificações de uma região não utilizada até então. Muitas enzimas parecem ser muito maiores do que seria necessário para executarem uma única função que exige um único sítio de ligação. As enzimas multifuncionais frequentemente possuem amplas áreas aparentemente não utilizadas de superfícies expostas ao solvente, e muitos bolsões na superfície que são passíveis de modificação para gerarem novos sítios de ligação. Uma vez que estas funções adicionais não interfiram com a função original da proteína, elas podem beneficiar a célula. Funções adicionais podem derivar da baixa especificidade de sítios ativos podendo surgir a partir da ampliação da especificidade de um sítio ativo ancestral até o ponto que a proteína possa catalisar reações que envolvam substratos múltiplos não relacionados, ou ainda que a proteína possa ligar-se a múltiplos outros componentes. Tais modificações poderiam surgir por mutações no sítio ativo ou a partir do uso de regiões cercando o sítio ativo. O oposto pode ser verdadeiro para outras enzimas, uma enzima ancestral pode ter sido capaz de ligar-se a vários ligantes, e sua especificidade pode não ter aumentado durante a evolução (Jeffery, 1999).

As proteínas multifuncionais podem também fazer parte de mecanismos de coordenação celular. Enzimas que afetam a atividade de outras enzimas que catalisam reações semelhantes fornecem um meio de modular a regulação. Enzimas que regulam sua própria transcrição ou tradução pelo princípio de disponibilidade de enzima, substrato ou produto fornecem um mecanismo de *feedback* sensível e direto que assegura que as células produzam apenas a quantidade de enzima necessária. Além disso, proteínas

envolvidas em múltiplas vias, como a trombina, permitem uma resposta ampla, que contribui de maneira mais significativa para todo o sistema do que proteínas que atuam individualmente (Jeffery, 1999).

Em muitos exemplos de proteínas multifuncionais, parece existir uma relação entre as múltiplas funções de cada proteína; entretanto, algumas proteínas não possuem uma conexão clara entre as suas funções. A proteína *band 3* da membrana plasmática de eritrócitos é mais conhecida como um trocador aniônico, mas também regula a taxa de progresso da glicólise (Low, *et al.*, 1993). Seu domínio amino terminal citoplasmático liga-se à aldolase, à gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e à fosfofrutoquinase, causando uma diminuição em suas atividades e uma acumulação de intermediários glicolíticos.

Algumas vezes duas funções de uma proteína multifuncional são conflitantes. Alguns exemplos são quando o padrão de expressão necessário para uma das funções pode não ser ideal para outra, ou ainda quando uma mutação aumenta a eficiência de uma das funções, mas compromete outra. Nestes casos, pode ser mais vantajoso segregar a função original da nova função em dois novos genes por meio de duplicação gênica. Um exemplo é a argininosucinato liase, a quarta enzima do ciclo da uréia; em patos e avestruzes ela é uma proteína multifuncional e também é a proteína cristalina dos olhos (Piatigorsky, *et al.*, 1988, Chiou, *et al.*, 1991). Em galinhas, entretanto, as duas funções de argininosucinato liase são executadas por duas proteínas altamente homólogas, uma das quais é uma forma enzimaticamente inativa trabalhando como uma proteína estrutural do cristalino do olho do animal. A sua contra parte é a enzima ativa que atua no ciclo da uréia.

Conseqüentemente, ao contrário do que acontece em patos e avestruzes, dois genes são necessários em galinhas para efetuar a função da proteína original (Piatigorsky, *et al.*, 1988).

Outro exemplo de duplicação gênica é o da enzima galactoquinase encontrada em *Kluyveromyces lactis* e *S. cerevisiae* (Rubio-Teixeira, 2005). Em *K. lactis*, a proteína catalisa o primeiro passo da via da utilização da galactose, e, adicionalmente, atua como um ativador transcricional para ela mesma e para outras proteínas da via da galactose (Meyer, *et al.*, 1991, Hittinger & Carroll, 2007). Sua função como ativador transcricional independe de suas outras atividades enzimáticas, assim como o contrário também é verdadeiro, a inativação de uma função pode não afetar a outra como mostram dados de mutagênese dirigida. Em *S. cerevisiae*, as duas funções da galactoquinase que ocorrem em *K. lactis* são, na verdade executadas por duas proteínas diferentes, mas altamente homólogas (Lohr, *et al.*, 1995, Platt, *et al.*, 2000). Entretanto, a galactoquinase de *S. cerevisiae* não perdeu completamente sua capacidade de ativar a transcrição de proteínas da via da galactose (Bhat & Hopper, 1992, Sellick, *et al.*, 2009).

A existência de proteínas multifuncionais nos organismos é um grande desafio na anotação dos genomas. Mesmo enzimas extensivamente estudadas podem ter funções ainda não descobertas. A descoberta de muitas proteínas multifuncionais foi inteiramente acidental (Piatigorsky & Wistow, 1989, Yoshida, *et al.*, 2001, Ozimek, *et al.*, 2003, Chen, *et al.*, 2005, Babady, *et al.*, 2007). Um dos motivos é de que as funções alternativas das proteínas multifuncionais são geralmente muito difíceis de serem preditas, pois muitas das funções não dependem de motivos conhecidos e conservados (Ozimek, *et al.*, 2003,

Babady, *et al.*, 2007). Além disso, as funções das proteínas multifuncionais, geralmente, não são conservadas (Yoshida, *et al.*, 2001, Ozimek, *et al.*, 2006, Zhao, *et al.*, 2009). Existem proteínas específicas que possuem diferentes funções alternativas em diferentes espécies. A enzima aconitase em *S. cerevisiae*, por exemplo, tem uma segunda função na manutenção do DNA mitocondrial (Chen, *et al.*, 2005); já em mamíferos (Kennedy, *et al.*, 1992, Philpott, *et al.*, 1994, Walden, *et al.*, 2006) e em *Mycobacterium tuberculosis* (Banerjee, *et al.*, 2007), ela está envolvida na homeostase de ferro. A aldolase é essencial para a montagem e atividade da H⁺-ATPase vacuolar em leveduras (Lu, *et al.*, 2001, Lu, *et al.*, 2007), mas sua capacidade de ligar-se à actina é importante para a invasão de células do hospedeiro em *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* (Wang, *et al.*, 1996, Buscaglia, *et al.*, 2003, Bosch, *et al.*, 2007).

Além das descobertas acidentais, algumas proteínas multifuncionais foram descobertas também utilizando ensaio de duplo híbrido em leveduras (Lu, *et al.*, 2001) e proteômica (Jeffery, 2005). Uma nova estratégia para procura ativa de proteínas multifuncionais em enzimas poderia envolver a comparação do fenótipo de linhagens nas quais a enzima é inativada por mutação pontual, com o fenótipo de linhagens onde o gene foi completamente deletado. No caso de um gene codificando uma proteína multifuncional, deveria existir uma discrepância entre os fenótipos.

O fenômeno da multifuncionalidade de proteínas revelou várias interações funcionais desconhecidas entre processos celulares e mostrou a importância da integração da rede de interações para o funcionamento adequado dos organismos. Há menos de 10 anos atrás, as proteínas multifuncionais eram um universo desconhecido dentro da biologia; desde a

proposta do conceito em 1999 por Constance Jeffrey, o número de casos reconhecidos de proteínas multifuncionais aumentou de maneira expressiva, e, mesmo assim, é muito provável que estejamos apenas raspando a superfície deste "iceberg". Dada a importância das funções identificadas em proteínas multifuncionais já estudadas e a relevância do fenômeno nos problemas básicos e aplicados, a sua existência urge por ser amplamente reconhecida.

Parafrazeando Huberts D.H.E.W. : a multifuncionalidade das proteínas é um fenômeno que ilustra a perspicácia da natureza. Ela é uma fonte de inspiração que deveria lembrar os cientistas para manterem sempre o inesperado em mente, mesmo quando se trata de aspectos exaustivamente investigados da biologia (Huberts & van der Klei, 2010).

2.1.3 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 (Figura 1). Esta mesma enzima é também capaz de catalisar a reação inversa. 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. Há relatos de envolvimento da enzima em uma variedade de funções exercidas no citosol e

no núcleo, que vão desde o seu papel na apoptose e na regulação da expressão gênica, até o seu envolvimento na regulação do influxo de Ca^{2+} do retículo endoplasmático. Relatos indicam que GAPDH interage com microtúbulos e participa na fusão de membranas celulares (Hernandez-Fonseca & Massieu, 2005, Hara & Snyder, 2006). Também em alguns patógenos humanos, 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.

A proteína GAPDH é amplamente aceita como uma proteína multifuncional, fato que é confirmado pelo crescente número de artigos atribuindo as mais variadas funções para a proteína. A acumulação da proteína no núcleo da célula, sob certas condições de cultivo, conforme descoberto há cerca de quinze anos atrás foi, um dado recebido com desconfiança e tratado como um erro experimental ou artefato de técnica, e que, por isso, foi negligenciado por muito tempo. Entretanto, análises mais modernas revelaram a importância da proteína GAPDH na apoptose, mostrando que quantidades altas da proteína são transferidas para o núcleo durante o processo.

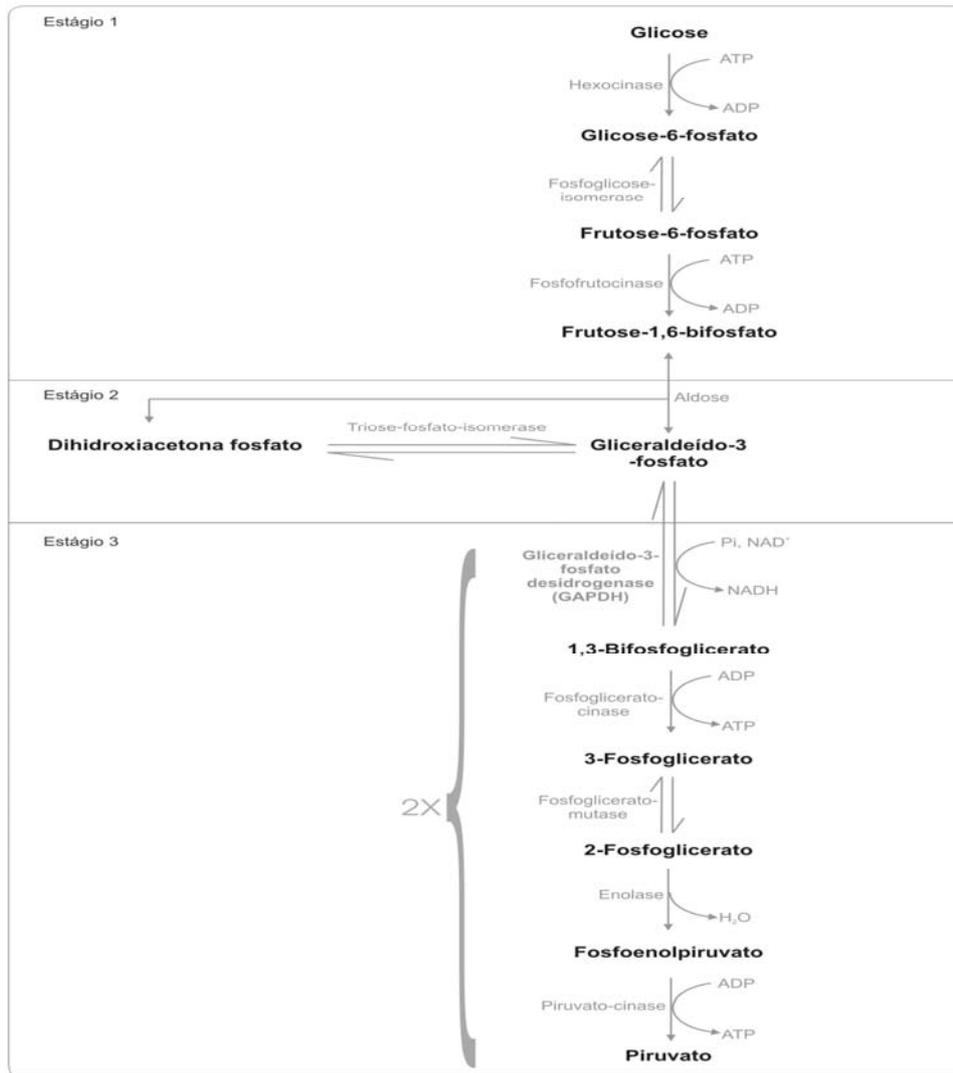


Figura 1. Glicólise. A glicólise pode ser dividida em três estágios: (1) desestabilização da molécula de glicose; (2) duas moléculas interconvertíveis de três carbonos são geradas pela clivagem de uma molécula de seis carbonos de frutose e (3) ATP é gerado

O uso de moléculas antisense, que atenuam a expressão do gene que codifica GAPDH, preveniu a entrada da enzima no núcleo da célula, impedindo a apoptose. A análise detalhada desse fenômeno mostrou que este comportamento da enzima é causado pelo seu papel em um via de sinalização até então não descrita, onde o monóxido de nitrogênio atuaria como um elicitador da apoptose (Hara & Snyder, 2006, Bryksin & Laktionov, 2008).

A associação de GAPDH com a membrana celular durante a separação de células foi descrito inicialmente na década de 1960 (De Duve, *et al.*, 1962), estimulando maiores estudos desta interação. A associação da enzima radio-marcada com mono camadas lipídicas sintéticas e vesículas de fosfatidilcolina / ácido fosfatídico foi estudada em várias razões molares (Wooster & Wrigglesworth, 1976, Wooster & Wrigglesworth, 1976). As constantes de associação da enzima com mono camadas lipídicas e vesículas foi determinada. A habilidade de GAPDH para influenciar o processo de fusão de membranas (atividade fusiogênica) foi estudada pela primeira vez por Morero *et al.*, (1985). Ao avaliar o efeito de Ca^{2+} e de várias proteínas (ribonuclease, concavalina A, BSA, protease, glucagon, lisozima, L-lactato desidrogenase, GAPDH de músculo de coelho e GAPDH de levedura) na fusão de lipídeos sintéticos constituídos de fosfolipídios, descobriu-se que GAPDH catalisa o processo de maneira notável. Desta forma, se concluiu que a incubação de vesículas na presença de GAPDH na concentração de 0,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 7,5, resulta na fusão completa da membrana em 120 segundos sem adição de Ca^{2+} (o efeito foi avaliado por transferência de energia por ressonância), enquanto o controle foi estável por mais de 60 horas (Morero, *et al.*, 1985). A concentração de enzima correspondia a cerca de três moléculas de GAPDH por vesícula.

Embora os dados de Morero e colaboradores tenham sido bastante convincentes, o fato de terem usado apenas vesículas compostas de fosfatidilcolina / ácido fosfatítico (9:1) limitava a comparação com vesículas de células de mamíferos. A fosfatidilcolina é um componente minoritário das membranas celulares destes animais, com exceção das membranas do retículo endoplasmático (54%) e do aparelho de Golgi (45%) (Dowhan & Bogdanov, 2002). (Glaser & Gross, 1995) mostraram indiretamente a inadequação do modelo de Morero e colaboradores, realizando um estudo com vesículas artificiais compostas de lipídios que representavam da maneira mais precisa possível as membranas celulares encontradas em células de mamíferos (27% de fosfatidilcolina, 27 % de fosfatidiletanolamina, 6 % de fosfatidilserina e 40 % de colesterol)

Em outro estudo, o mesmo grupo investigou o efeito da plasmiletanolamina na composição das membranas na taxa de fusão das vesículas (Glaser & Gross, 1994). A plasmiletanolamina é um componente majoritário de vários tipos de membranas que sofrem fusão rápida (por exemplo, membranas plasmática, membranas de vesículas sinápticas). O modelo proposto pelo grupo sugere a presença de uma proteína catalisadora acelerando o processo de fusão das membranas. A busca por tal proteína catalisadora em extratos citosólicos de cérebro de ratos por fracionamento cromatográfico levou a identificação da proteína como sendo uma isoforma de GAPDH (Glaser & Gross, 1995). Um resultado interessante foi que a adição da proteína a vesículas lipídicas que não continham plasmiletanolamina não resultou em fusão, efeito este que foi revertido pela adição da isoforma de GAPDH, revelando sua atividade fusiogênica (Glaser & Gross, 1995). Esse

dado dá suporte à hipótese de que a fusão de membranas mediada por GAPDH é estritamente dependente da composição destas e que independe da presença de Ca^{2+} .

Outra observação interessante foi a de que a atividade fusiogênica é dependente da ativação da enzima GAPDH. Os dados apresentados mostram que a ativação ocorre por provavelmente dois passos: (i) liberação do inibidor e (ii) modificação. Extratos citosólicos (contendo GAPDH) não possuíam atividade fusiogênica, o que sugere a presença de um inibidor da enzima no citosol da célula em questão. Após uma busca infrutífera pelo inibidor citosólico de GAPDH, alguns experimentos apresentaram resultados inesperados, pois o mesmo não podia ser eliminado por diálise, era suscetível à inativação por calor elevado e era sensível ao tratamento com tripsina, revelando assim que o inibidor se tratava de uma proteína, e que mais tarde foi identificada como tubulina (Glaser, *et al.*, 2002).

A interação de GAPDH com tubulina foi demonstrada em 1983 por Kumagai *et al.*, (1983). A tubulina é uma proteína do citoesqueleto de eucariotos que dirige o movimento de vesículas e vacúolos na célula. A molécula de tubulina é um heterodímero formado por duas subunidades globulares – α -tubulina e β -tubulina – e são as unidades formadoras dos microtúbulos. A β -tubulina é uma estrutura dinâmica que pode ter sua montagem catalisada por outros fatores, incluindo proteínas. Utilizando a alteração na absorção no comprimento de onda de 350 nm e microscopia eletrônica, Kumagai *et al.*, (1983) monitoraram a montagem de microtúbulos e descobriram a interação de GAPDH com os microtúbulos durante uma investigação sobre proteínas que catalisam a montagem de microtúbulos, e

ainda demonstraram que a taxa de montagem dos microtúbulos aumenta pela adição de GAPDH.

Ainda é extremamente interessante que a interação de GAPDH com a tubulina inibe não apenas sua atividade fusiogênica (Glaser, *et al.*, 2002), como mencionado acima, mas também sua atividade glicolítica (Volker & Knoll, 1993) e, dessa forma, a tubulina pode ser considerada como um regulador universal da atividade de GAPDH.

Esses dados em conjunto indicam que GAPDH poderia participar em passos importantes do transporte vesicular, que é conhecido como movimento de vesículas mediado por microtúbulos (fornecendo, por exemplo, afinidade aumentada pelos microtúbulos) e na fusão de vesículas com membranas alvo. Ainda não é claro, entretanto, sob quais condições a proteína GAPDH poderia encontrar-se associada com membranas de vesículas. O modelo anteriormente descrito de estudo *in vitro* da associação da proteína com vesículas é limitado demais para reproduzir o processo biológico em toda a sua complexidade.

Tisdale *et al.*, (2001, 2002, 2004) realizaram experimentos *in vivo* com a finalidade de estudar o transporte vesicular da via de secreção prematura, a qual inclui todos os transportes vesiculares entre o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi. Um estágio intermediário deste transporte é o agrupamento vesicular-tubular (AVT), onde as proteínas transportadas são inicialmente distribuídas. O transporte do retículo endoplasmático para o AVT se processa principalmente pela via da COPII, a qual difere da via da clatrina. No primeiro estágio desta via, Sar1-GTPase citoplasmática ligada à GDP reconhece a proteína de membrana Sar12 do retículo endoplasmático que catalisa a substituição do GDP por GTP do complexo, e que acarreta na modificação

conformacional de Sar1 (extensão de uma porção hidrofóbica da proteína e seu ancoramento na membrana do retículo endoplasmático) (Springer, *et al.*, 1999). Sar1-GTPase ancorado serve como um sítio de ligação para o complexo Sec23/Sec24, o qual tem papel importante na “protrusão” das vesículas (Bi, *et al.*, 2002). Neste estágio da protrusão, Rab1-GTPase endereça o AVT para o seu alvo de entrega (Grosshans, *et al.*, 2006) (Figura 2).

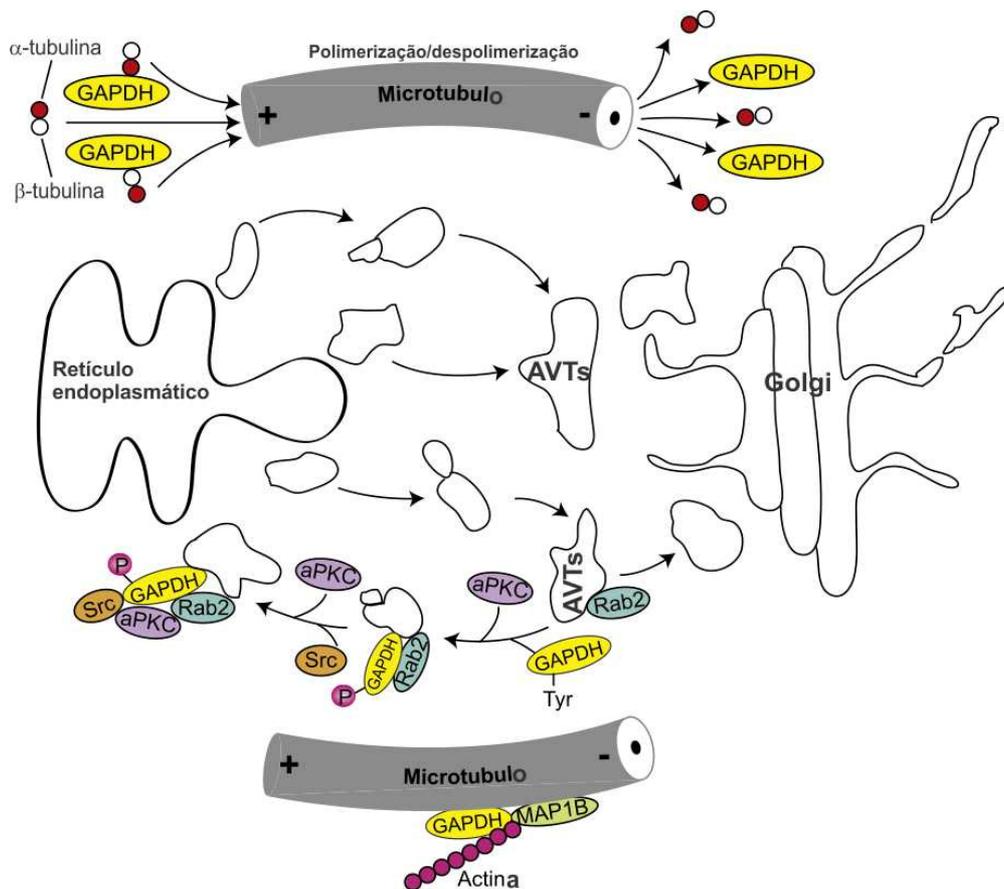


Figura 2. GAPDH em associação com citoesqueleto e com o transporte vesicular.

GAPDH interage com tubulina e com actina facilitando a montagem dos microtubulos e a polimerização da actina. GAPDH pode ser transportada dentro das células via microtubulos. GAPDH também tem uma papel importante nas AVTs (Agrupamentos Vesiculares Tubulares) onde a GAPDH fosforilada pela proteína quinase atípica (aPKC) é recrutada. Esse processo tem um papel importante no transporte entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi sem a necessidade da atividade glicolítica de GAPDH. A tirosina quinase Src medeia a fosforilação de aPKC, facilitando a associação de Rab2-Src-aPKC-GAPDH nas AVTs, e GAPDH fosforilada promove a interação dos microtubulos e proteínas motoras com vesículas contendo por Rab2 (modificado de Tristam, *et al.*, 2010)

A montagem da vesícula se completa com a adição do complexo Sec13/Sec31 e com a adição da proteína fibrilar Sec16. Após o desligamento da vesícula da membrana do retículo endoplasmático, Sec23 interage com Sar1, isto causa a hidrólise do GTP, reversão conformacional de Sar1 e liberação de outras proteínas acessórias (Bi, *et al.*, 2002, Grosshans, *et al.*, 2006). A vesícula é então transportada para o AVT via microtúbulos (do pólo positivo para o pólo negativo), utilizando o complexo dineína-dinactina como motor (Presley, *et al.*, 1997). Na fusão das vesículas o complexo SNARE é formado - complexo GM130-p115 e a proteína transmembrana giantina – constituintes das vesículas de membrana e do AVT, respectivamente (Sonnichsen, *et al.*, 1998, Beard, *et al.*, 2005). A formação do complexo SNARE é considerada o principal fator na fusão das vesículas com o AVT.

O transporte retrógrado do AVT para o retículo endoplasmático ocorre principalmente pela via menos estudada conhecida como via COPI retrógrada (Bethune, *et al.*, 2006). Ainda não é muito claro como o tráfego mediado por vesículas COPI é dividido em anterógrado e retrógrado e também é responsável por uma parte do transporte do retículo endoplasmático para o Golgi. Rab2-GTPase foi estudada por Tisdale *et al.*, (1999) que encontraram a proteína em associação com vesículas COPI retrógradas, e que possivelmente estariam definindo a direcionalidade do transporte do AVT para o retículo plasmático A investigação de vesículas contendo Rab2 mostrou que elas nunca contêm componentes anterógrados (direcionando para o Aparelho de Golgi), mas contém p53/gp58, proteína quinase C α / λ (PKC α / λ)(Tisdale, *et al.*, 1992, Tisdale, 2001) e GAPDH (Tisdale, 2001). O estudo da função de GAPDH como

componente deste tipo de vesículas irá permitir uma reavaliação do seu papel no transporte vesicular.

Existem alguns trabalhos que abordam essa questão. Inicialmente, Tisdale *et al.*, (2001) demonstraram que anti-soros policlonais contra GAPDH bloqueiam o transporte entre o retículo endoplasmático e AVT em células NRK transfectadas com o vírus ts-405 (uma cepa sensível à temperatura). Nesse sistema o vírus sintetiza proteínas que são acumuladas no retículo endoplasmático a 39,5 °C e com a diminuição da temperatura para 32 °C elas são transportadas para o Golgi, incluindo vesículas contendo Rab2 (Gallione & Rose, 1985). A incubação destas células com o anticorpo policlonal contra GAPDH impede o transporte das proteínas virais. Essa abordagem demonstra que mais que 60 % das proteínas virais são transportadas por uma via dependente de GAPDH.

Em um segundo momento, o efeito da concentração de Rab2-GTPase na concentração de GAPDH e a co-relação com as vesículas recém formadas foi avaliado. Foi demonstrado que a incubação de 30 µg de microsossomos isolados de cultura de células NRK com 50 ng de Rab2-GTPase resultou em um aumento de 50 vezes na concentração de GAPDH associado com os microsossomos (Tisdale, 2001). Os mesmos autores, em trabalhos anteriores, demonstraram que a incubação de microsossomos contendo Rab2 causou a ligação com os coatômeros de membrana β-COP e a proteína quinase Ci/λ (Tisdale & Jackson, 1998, Tisdale, 2000). Estudos posteriores investigando a ligação de Rab2 a microsossomos dependentes de GAPDH, demonstraram que GAPDH interage diretamente com o domínio regulatório PKCi/λ (resíduos de

aminoácidos 1-247), podendo servir como substrato para o mesmo (Tisdale, 2002).

Estudos mais detalhados demonstraram que GAPDH interage diretamente com Rab2 (as proteínas foram detectadas por co-precipitação utilizando anticorpo contra Rab2). A interação foi melhor comprovada também pelo sistema duplo híbrido, por meio do qual o sítio de interação de GAPDH com Rab2 pode ser localizado, entre os resíduos 20-50 (Tisdale, *et al.*, 2004).

Com base nestes dados Tisdale *et al.*, (2004) propuseram uma hipótese onde um complexo triplo composto Rab2–PKC α /λ–GAPDH é formado na superfície de vesículas COPI retrógradas. GAPDH, como componente deste complexo, seria submetido à fosforilação por PKC α /λ. Foi demonstrado que a forma GAPDH fosforilada (pGAPDH) é um fator de ligação da β-tubulina aos microsomos, pois a desfosforilação de pGAPDH associada aos microsomos causa significativa dissociação de β-tubulina da superfície dos microsomos (Tisdale, 2002). Os autores demonstraram que ocorre associação de GAPDH com o Golgi na sua forma tetramérica e sugeriram que a atividade glicolítica da enzima seria importante na sua participação no transporte vesicular. A fim de testar esta hipótese, GAPDH selvagem e uma forma mutante glicoliticamente inativa (substituição C149G) foram testados.

Tanto a forma mutante quanto a proteína selvagem foram capazes de se associar de maneira eficiente aos microsomos na sua forma tetramérica. Estudos quantitativos da interação da proteína GAPDH mutante com Rab2 e PKC α /λ não revelaram nenhuma diferença significativa entre a forma mutante e a forma selvagem da proteína (Tisdale, 2002, Tisdale, *et al.*, 2004). Os dados indicam que o papel de GAPDH no transporte do Aparelho de Golgi para o

retículo endoplasmático é completamente independente da sua função glicolítica, e que a forma fosforilada de GAPDH acelera a montagem dos microtúbulos e aumenta a afinidade das vesículas por eles (Tisdale, *et al.*, 2004).

Em suma, os dados encontrados na literatura, relativos ao transporte vesicular, indicam que GAPDH participa no transporte retrógrado entre o AVT e o retículo endoplasmático. Este transporte é realizado pelas vesículas COPI e principalmente serve para o transporte de proteínas entregues ao AVT por engano ou que são constituintes de vesículas COPII e necessitam de transporte reverso para subsequente reciclagem. A montagem destas vesículas é iniciada, na maioria dos casos, pela acumulação de proteínas transmembrana, como gp58/p53, as quais são reconhecidas e servem como suporte para a ancoragem das GTPases citosólicas Arf1 e Rab2. Arf1 e Rab2 associadas a GDP são então ativadas pela interação com proteínas transportadoras (p23/p24 no caso de Arf1), o que resulta na substituição do GDP pelo GTP e ancoramento de proteínas na membrana do AVT. Arf1 e Rab2 então favorecem a ligação de coatômeros e a vesícula se desliga da membrana do AVT. A ligação de ArfGAP, α _COP, γ 1_COP, δ _COP, β _COP, β' _COP, ϵ _COP, ζ 1_COP, γ 2_COP, e ζ 2_COP à vesícula é mediada por Arf1 (Bethune, *et al.*, 2006). Rab2 forma um complexo triplo com PKC ι/λ e o tetrâmero de GAPDH e medeia a ligação de β _COP (Tisdale, 2005, Tisdale & Artalejo, 2006).

Após desligar-se da membrana, Arf1 medeia a hidrólise de GTP, o que causa a dissociação de Arf1 e dos coatômeros associados na superfície da vesícula retrógrada. É possível que neste estágio, TyrK ligue-se na PKC ι/λ

mediando a subsequente fosforilação de PKC ι / λ . PKC ι / λ fosforilada, por sua vez, fosforila alguma das subunidades do tetrâmero de GAPDH e isso fornece uma ligação estável das vesículas aos microtúbulos, pois a forma desfosforilada de GAPDH liga-se à α -tubulina enquanto a pGAPDH liga-se à β -tubulina. Em teoria, tal interação poderia funcionar como um motor vesicular para o transporte de vesículas do AVT para o retículo endoplasmático, pois o Aparelho de Golgi como via de regra (em células animais) está posicionado próximo ao centro da célula do ponto de vista organizacional dos microtúbulos (Lippincott-Schwartz, *et al.*, 1995, Appenzeller-Herzog & Hauri, 2006), ou seja, na mesma região onde a extremidade menos do microtúbulo está localizada.

Microtúbulos consistindo de blocos de α e β -tubulina sempre suportam α -tubulina na sua extremidade menos, na qual a forma GAPDH não modificada liga-se eficientemente. Após fosforilação de GAPDH, esta forma pode ligar-se eficientemente à tubulina, acessível apenas como unidade secundária do microtúbulo na direção do AVT para o retículo endoplasmático. Para GAPDH atuar como um motor, ou a presença de uma proteína hipotética desfosforilando pGAPDH, ou a substituição do monômero fosforilado por um monômero desfosforilado no citosol é necessária. Na última hipótese, a forma fosforilada pGAPDH poderia permanecer ligada à penúltima unidade de β -tubulina por algum tempo, bloqueando assim o movimento reverso da vesícula. Contudo, como o movimento nos microtúbulos é quase sempre constante, a interação da próxima vesícula com a origem dos microtúbulos, e, portanto, o bloqueio do sítio para movimento reverso de uma vesícula indo à frente, deve ser auto suficiente para o processo do transporte unidirecional.

Como mostrado por Tisdale *et al.*, (2002), GAPDH é fosforilada via resíduo Ser, enquanto Robbins *et al.*, (1995) mostraram que a substituição do resíduo Ser234 pelo Pro234 resultava no mau funcionamento do transporte vesicular. Por outro lado, quinesinas e dineínas, duas principais proteínas motores que definem o movimento ao longo dos microtúbulos, foram identificadas como componentes do AVT (Lippincott-Schwartz, *et al.*, 1995, Roghi & Allan, 1999). Entretanto, Lippincott-Schwartz *et al.*, (1995) observaram que a quinesina, como constituinte do AVT, está inativa e se dedica a um trabalho de transporte futuro em cisternas do Golgi, onde fornecerá movimento periférico de vesículas secretórias de clatrina ao longo dos microtúbulos após a sua ativação.

Em contrapartida, o mecanismo de secreção de macromoléculas por células fúngicas ainda não foi totalmente elucidado. As células fúngicas são encapsuladas em uma parede celular que possui poros, mas que essencialmente é de natureza até o momento considerada rígida, composta de polissacarídeos, proteínas e pigmentos (Nimrichter, *et al.*, 2005). Diferentes estudos demonstram que estruturas com massa molecular maior de 1000 kDa podem atravessar a parede celular e alcançar o meio extracelular (McFadden, *et al.*, 2006, McFadden, *et al.*, 2006, Schmid, *et al.*, 2007). Rodrigues *et al.*, (2008), assim como outros grupos, demonstraram que o componente majoritário da cápsula polissacarídica do fungo *Cryptococcus neoformans*, glicuronoxilomanana (GXM), é sintetizado intracelularmente e então transportado para o espaço extracelular, e que esse transporte é realizado por meio de transporte vesicular (vesículas com bicamadas enriquecidas com lipídeos próprios de fungos, como glicosilceramida e esteróis). A existência

desse processo levanta a possibilidade de que outras moléculas poderiam ser exportadas utilizando o mesmo mecanismo.

Com base nisso, Rodrigues *et al.*, (2008) levantam a hipótese de que a secreção extracelular por meio de vesículas, em *C. neoformans*, é um mecanismo geral de transporte de componentes protéicos, lipídicos e sacarídicos através da parede celular para o espaço extracelular. O grupo identificou ainda várias moléculas relacionadas à virulência nas vesículas de *C. neoformans* por espectrometria de massas, dentre as quais estavam a proteína GAPDH. A presença combinada de lipídeos, pigmentos, polissacarídeos e proteínas relacionadas à virulência sugerem que *C. neoformans* utiliza o mecanismo de secreção para entregar fatores de virulência no espaço extracelular.

O envolvimento de GAPDH com as mitocôndrias e a relação que a proteína tem com o processo de morte celular independente de caspase é outra função interessante. Sabe-se que as células sob condições normais apresentam níveis baixos de GAPDH nas mitocôndrias, enquanto que sob estresse os níveis da proteína se elevam (Tarze, *et al.*, 2007). Quando GAPDH é expressa exógenamente, um *pool* da proteína localiza-se na mitocôndria e induz a permeabilização pró-apoptótica da membrana mitocondrial (PMM) via associação com canais aniônicos dependentes de voltagem (CADV)(Tarze, *et al.*, 2007). A expressão exógena leva também à perda do potencial da transmembrana interna, inchaço da matriz, permeabilização da membrana interna mitocondrial e liberação de duas proteínas pro-apoptóticas: citocromo c e o fator de indução apoptótica (Figura 2) (Tarze, *et al.*, 2007). Ainda não está claro se modificações pós-traducionais podem ter algum papel no

endereço de GAPDH para a mitocôndria assim como na interação dela com proteínas mitocondriais.

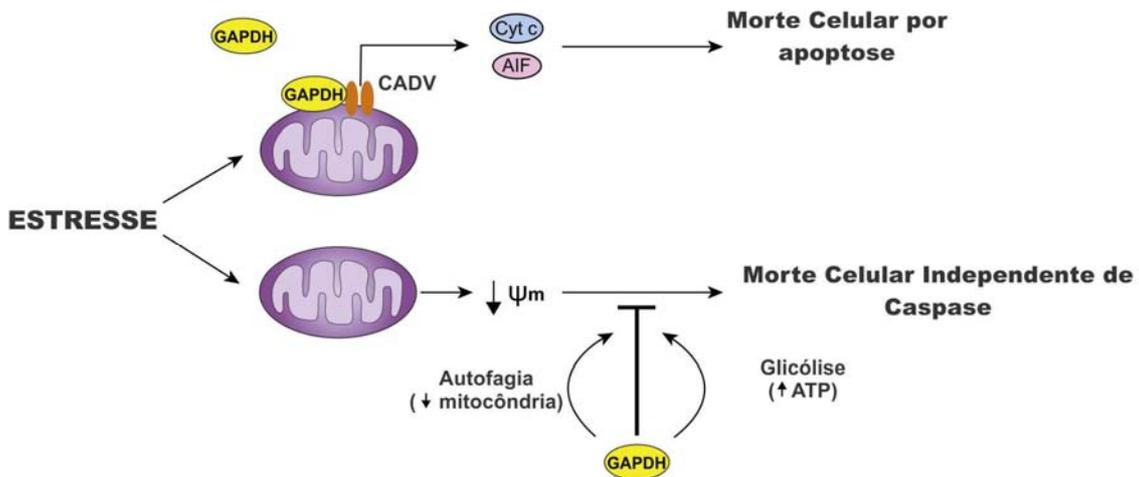


Figura 3. GAPDH nas mitocôndrias. GAPDH foi localizada nas mitocôndrias e possui funções distintas dependentes do contexto celular. GAPDH pode ligar-se ao CADV, o qual promove a liberação de citocromo c e de fatores indutores de apoptose, levando à morte celular por apoptose. Sob condições de estresse, uma diminuição no potencial da membrana mitocondrial (Ψ_m) leva a morte celular independente de caspase (MCIC). Nesse contexto, GAPDH inibiria a morte celular por simultaneamente, aumentar os níveis de ATP gerados na glicólise e por estimular a autofagia de mitocôndrias permeabilizadas (modificado de Tristam, *et al.*, 2010).

Em contraste, outros estudos relatam que GAPDH participa na recuperação da permeabilização da membrana externa mitocondrial (PMEM)(Colell, *et al.*, 2007). Sob esta condição, GAPDH protege as células da morte por PMEM, na ausência de ativação por caspase (Figura 2). Sob esse aspecto a associação de GAPDH com a sobrevivência da célula poderia ocorrer pelo fornecimento de ATP em quantidades suficientes para manter o

potencial de membrana mitocondrial pela ATPase F_0F_1 , auxiliando assim a anular o efeito do colapso energético ocasionado pela perda da função mitocondrial. Como uma enzima chave da via glicolítica, GAPDH aumenta o fluxo de energia para a via anaeróbia e isso permite que as células mantenham níveis de ATP acima dos limites críticos após o colapso das mitocôndrias.

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*. *Mucor 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 & Arnau, 2002).

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) (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 promotor do gene *gpd1*. Mais especificamente, os autores observaram que a indução por fonte de carbono e o efeito das concentrações de substratos (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. Uma vez 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*, sugerindo que a expressão do gene *gpd1* de *M. circinelloides* poderia ser regulada por estresse térmico (Larsen, *et al.*, 2004).

Egea *et al.*, (2007) descreveram que a proteína GAPDH é secretada pelos patógenos gram-negativos *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) e enteropatogênica (EPEC), podendo também estar associada com a superfície

celular destes. Em ambos os casos é fato que a proteína é enzimaticamente ativa, o que indica a manutenção da estrutura da proteína no processo de exportação, mantendo a possibilidade de diferentes funções extracelulares para a GAPDH. Isto é especialmente relevante para uma proteína multifuncional. Da mesma forma, a proteína glicolítica secretada enolase de *Aeromonas hydrophila* (Sha, *et al.*, 2003) e GAPDH de *Streptococcus* sp. (Pancholi & Fischetti, 1992) também foram descritas com atividade no lado externo da célula. GAPDH, assim como outras proteínas consideradas *housekeeping* e multifuncionais em patógenos, são exportadas por um mecanismo desconhecido, considerando a ausência de uma sequência sinal ou domínio hidrofóbico.

Recentemente, um estudo proteômico realizado com *Listeria monocytogenes* permitiu a identificação de 17 proteínas exportadas através do sistema de secreção dependente de SecA2 (Lenz, *et al.*, 2003). Isto inclui proteínas citosólicas clássicas que não apresentam um sinal típico de secreção, como EF-Tu ou enolase. A secreção de proteínas é o principal mecanismo de comunicação entre os patógenos e o principal veículo de intoxicação de células do hospedeiro. A secreção de elementos por bactérias gram-negativas é dificultada pelo fato do envelope bacteriano consistir de duas bicamadas lipídicas, com periplasma entre elas. Por esta razão as bactérias gram-negativas desenvolveram muitas estratégias para possibilitar que determinadas proteínas alcancem o espaço extracelular (Saier, 2006).

Uma destas estratégias consiste de exportação mediada por vesículas. As vesículas são liberadas do envelope de bactérias gram-negativas em desenvolvimento e funcionam como veículos de secreção. Vesículas externas

à membrana contendo proteínas de membrana, lipopolissacarídeos, fosfolípídeos, autolisinas ou hemolisinas têm sido encontradas nestas vias (Wai, *et al.*, 2003, Kuehn & Kesty, 2005, Balsalobre, *et al.*, 2006).

Contudo, Egea *et al.*, (2007) mostraram que a exportação de GAPDH em EHEC e EPEC não é mediada pela via de secreção por vesículas. GAPDH secretada foi encontrada no sobrenadante de células como uma proteína preferencialmente solúvel. Mesmo existindo dados que mostrem a presença de GAPDH no periplasma e em associação com as membranas internas e externas, a proteína não é incorporada durante a formação de vesículas. De maneira alternativa, a liberação seletiva de proteínas poderia ser considerada uma possível explicação ao problema, uma vez que a liberação da proteína periplasmática no meio foi observada na ausência de lise celular (Rinas & Hoffmann, 2004). Isto indica que a membrana externa assim como a membrana citoplasmática não são compartimentos fechados, mas sim de porosidade variável, dependendo da circunstância. Uma vez que o envelope bacteriano é extremamente importante para os patógenos, pois muitos determinantes de virulência residem nele, ou ainda muitos precisam passar através dele, os microrganismos acabaram desenvolvendo mecanismos para regular a permeabilidade da superfície de suas células.

Considerando o papel hipotético da GAPDH extracelular de EHEC ou EPEC no processo de infecção, Egea *et al.*, (2007) mostraram que a proteína interage com plasminogênio e fibrinogênio. Atividade plasminogênio ligante de enzimas bacterianas extracelulares, como GAPDH ou enolase, tem sido relatada como mecanismo de patogenicidade. A plasmina, a forma ativada do plasminogênio, pode degradar proteínas da matriz extracelular e promover

migração bacteriana (Bergmann, *et al.*, 2005). Neste sentido, a proteína extracelular GAPDH de EHEC ou EPEC, exposta na superfície bacteriana ou secretada nas proximidades da célula hospedeira, pode contribuir para a migração destes patógenos através da mucosa do trato gastrointestinal.

Trabalhos recentes investigando o fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis* demonstraram fortes evidências de envolvimento da enzima GAPDH na adesão e na infecção do fungo 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, e uma diminuição nos níveis protéicos e transcricional na forma micelial (Barbosa, *et al.*, 2006). 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 na parede celular do fungo por imunomicroscopia eletrônica. Foi demonstrada a afinidade de GAPDH a 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 tratadas 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 a 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 a 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 NAD⁺: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.*, 2003).

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 RNAPolimerase II. Além disso, GAPDH pode ligar-se às proteínas recombinantes Rb4/Rb7. Esse resultado sugere que Rb7 medeia 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 holoenzima polimerase II.

Existem trabalhos que descrevem gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase com regulação pela ritmicidade circadiana (Shinohara, *et al.*, 1998, Fagan, *et al.*, 1999, Morre, *et al.*, 2002, Greene, *et al.*, 2003). O ritmo circadiano obedece o foto período e é gerado e controlado por “relógios” biológicos endógenos compensados pela temperatura e que podem ser “resetados” por alguns fatores ambientais. Esse ritmo já foi observado em uma ampla variedade de microorganismos, de bactérias á mamíferos e são coordenados por ciclos ambientais que limitam a atividade em certos momentos do dia. Um aspecto importante da ritmicidade circadiana envolve o controle de genes específicos.

No fungo *Neurospora crassa*, o gene *ccg-7* (*clock-controlled gene-7*) que apresenta alta similaridade ao gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, apresenta regulação pela ritmicidade circadiana tanto na acumulação dos seus níveis de transcritos como na atividade da enzima (atividade de GAPDH), onde o pico de atividade de GAPDH apresenta um atraso de várias horas em relação ao pico de acumulação dos transcritos do gene durante a noite (Shinohara, *et al.*, 1998). Através da regulação de GAPDH, o ritmo circadiano poderia

controlar a via glicolítica e desta forma influenciar as atividades metabólicas fundamentais do microrganismo. A regulação de GAPDH pelo ritmo circadiano sugere que a sua influência tem grande importância no nível celular.

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 blot*”, ensaio de proteção à RNase, “*microarray*”, e qRT-PCR. Independente da metodologia utilizada, a normalização usando genes que efetivamente não apresentam variação nos níveis de transcritos do sistema e condição experimental específicos 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, *et al.*, 2006).

2.2 O agente bio-controlador *Metarhizium anisopliae*

Inicialmente identificado como *Entomophthora anisopliae* por Metchnikoff em 1883, *M. anisopliae* é um fungo filamentosos que possui a capacidade de infectar e ser letal para cerca de 300 espécies de artrópodes, incluindo desde

insetos até ácaros (Roberts & St Leger, 2004). Além de parasitar artrópodes pragas da pecuária e agricultura, como o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Frazzon, *et al.*, 2000) e o gafanhoto *Schistocerca gregaria* (Tounou, *et al.*, 2008), respectivamente, *M. anisopliae* também tem a capacidade de controlar vetores de doenças humanas, como o transmissor do vírus da dengue *Aedes aegypti* (Scholte, *et al.*, 2007), da malária *Anopheles gambiae* (Scholte, *et al.*, 2006), da doença de Chagas *Triatoma infestans* (Luz, *et al.*, 1998) e a mosca tsé-tsé *Glossina* sp. (Kaaya & Munyinyi, 1995).

Devido a estas características e a sua resistência a fatores ambientais, como luz ultravioleta de diversos comprimentos de onda (Braga, *et al.*, 2006), temperatura, uma vez que o fungo pode desenvolver-se em uma faixa de 15 °C até 45 °C (Arruda, *et al.*, 2005, Li & Feng, 2009), e pH, variando de valores de 2,0 a 8,5, *Metarhizium* vem sendo utilizado como agente de controle biológico de inúmeras pragas (Lord, 2005). A morfologia de conídios e da colônia de *M. anisopliae* é característica e permite sua identificação em condições de laboratório. A espécie *M. anisopliae*, a qual inclui a linhagem selvagem utilizada neste trabalho, é filamentosa, possuindo micélio hialino em meio de cultura específico. Assexuadamente, produz conídios pigmentados verde escuro, fato que auxilia na proteção à luz UV, dispostos em coluna na extremidade dos conidióforos. São cilíndricos, com tamanhos que variam de 3,5 a 1,8 µm de comprimento (Alves, 1998). Em 2001, Liu *et al.*, (2001) isolaram a fase teleomórfica *Metacordyceps brittlebankisoides* (anamorfo *M. anisopliae* var. majus). Até então, apenas seus ciclos de reprodução assexuada e parassexual, por meio de heterocariose, eram conhecidos (Arruda *et al.*, 2005).

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. Este fungo infecta mais de 300 espécies de insetos, incluindo pragas importantes tanto para agricultura como para pecuária (Alves, 1988). 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.

No Brasil, *M. anisopliae* é utilizado com sucesso desde 1965, para o controle da cigarrinha-da-cana (*Mahanarva posticata*) e, a partir daí, houve a instalação de laboratórios na região Nordeste para viabilizar sua utilização no controle biológico (Marques, *et al.*, 1981). Sua utilização tem aumentado nos últimos anos, atingindo milhares de hectares. Tal sucesso possibilitou a diminuição do uso de produtos químicos que inicialmente era de 150.000 ha/ano para 12.000 ha/ano, ou seja, uma redução de mais de 90% (Melo & Azevedo, 1998), havendo ainda, perspectivas para sua utilização em nível comercial em outros países (Fernandez, 2000). Além do controle da cigarrinha-

da-cana, *M. anisopliae* é utilizado no Brasil para controlar a broca da cana-de-açúcar (*Diatrea saccharalis*), a cigarrinha das pastagens (*Deois flavopicta* e *Zulia entreriana*), percevejos da soja dos gêneros *Nezara* e *Piezodorus*, broca do café (*Diploschema rotundicollee*) e broca do rizoma (*Cosmopolites sordidus*) em bananeira (Alves, 1998).

Em trabalhos experimentais, o fungo foi testado com sucesso sobre larvas de *Lucilia sericata* (Wright, *et al.*, 2004), *Dysdercus peruvianus* (Lubeck, *et al.*, 2008), *Musca domestica* (Alves, 1998) e ectoparasitos de abelhas *Varroa destructor* (Kanga, *et al.*, 2003). Sua patogenicidade tem sido ainda demonstrada para alguns vetores de doenças humanas (Sherlock & Guitton, 1982, Silva & Messias, 1986, Scholte, *et al.*, 2003) e para carrapatos de diferentes gêneros e espécies (Kaaya, *et al.*, 1996, Zhioua, *et al.*, 1997, Frazzon, *et al.*, 2000, Farenhorst, *et al.*, 2008).

2.3 O processo de infecção de *Metarhizium anisopliae*

O processo de infecção inicia com a deposição do conídio no exoesqueleto do hospedeiro seguido pela adesão, e, sob condições adequadas de umidade e temperatura, ocorre a germinação (Schrank & Vainstein, 2010). A adesão é essencial para o início da infecção e envolve a interação hidrofóbica entre as proteínas da superfície do conídio (como hidrofobinas, Fang *et al.*, 2007) e a camada lipídica que recobre o exoesqueleto do artrópode. A degradação de lipídios foi recentemente descrita em associação com o desenvolvimento de pré-penetração de *M. anisopliae* na cutícula do hospedeiro (Jarrold, *et al.*, 2007). Estas moléculas estão presentes na epicutícula, a

primeira barreira contra microrganismos patógenos de artrópodes, reforçando a importância das enzimas lipolíticas no estágio inicial da infecção. As lipases produzidas por *M. anisopliae* já foram relacionadas como parte do processo (Silva *et al.*, 2005), e também já foram identificadas na superfície dos conídios. De fato a degradação da camada lipídica do hospedeiro pode ser importante para o reconhecimento de um hospedeiro suscetível assim como para a produção das primeiras moléculas de nutrientes que irão dar suporte ao início da germinação do conídio (Silva, *et al.*, 2009). MAD1, proteína com função de adesina, possui importante papel na adesão do conídio, quando ocorre desenvolvimento de turgor na superfície do hospedeiro. Foi sugerido também que a proteína MAD1 poderia substituir as hidrofobinas que são degradadas na medida que a parede celular do conídio degenera (Wang & St. Leger, 2007).

M. anisopliae infecta hospedeiros via penetração direta através do exoesqueleto. Para facilitar a descrição, o processo de infecção pode ser dividido nas seguintes etapas: (1) adesão do conídio à cutícula do hospedeiro através da interação de hidrofobinas e material mucilaginoso; (2) germinação do conídio e desenvolvimento; (3) diferenciação do tubo germinativo em apressório; (4) penetração na cutícula; (5) diferenciação das hifas em blastosporos / corpos hifais na hemolinfa do hospedeiro; (6) colonização do hospedeiro; (7) extrusão para a superfície do cadáver do hospedeiro e (8) formação de conidióforos e produção de conídios (Schrank & Vainstein, 2010)(FIGURA 1).

Estruturas da superfície, topologia e composição química da cutícula dos artrópodes também podem afetar a adesão do esporo (Lord & Howard, 2004, Pedrini, *et al.*, 2007). *M. anisopliae* é capaz de reconhecer sinais específicos do

hospedeiro, provavelmente lipídios da epicutícula, sendo a especificidade decorrente destes sinais (Pedrini *et al.* 2007). Segundo St. Leger *et al.*, (1991), os componentes presentes na epicutícula são extremamente heterogêneos, inclusive entre artrópodes do mesmo gênero. Após o contato e adsorção sobre o tegumento do hospedeiro, o esporo germina e o fungo desenvolve-se iniciando todo o processo de infecção

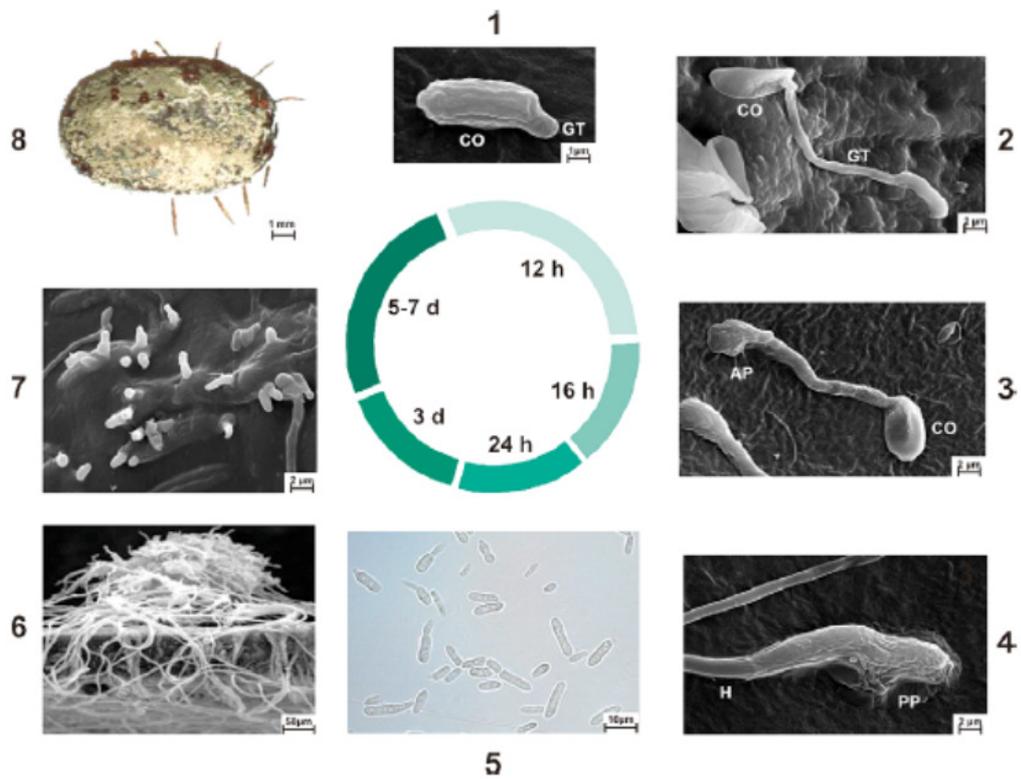


Figura 4. Processo de infecção de *M. anisopliae* no hospedeiro (modificado de Schrank & Vainstein, 2010). Os eventos de infecção foram descritos utilizando carrapatos como modelo. (1) MEV da adesão do conídio à cutícula do hospedeiro; (2) MEV da germinação do conídio; (3) MEV da diferenciação do tubo germinativo em apressório; (4) MEV da penetração da cutícula; (5) microscopia ótica da diferenciação da hifa em blastosporos; (6) MEV da colonização do hospedeiro; (7) MEV da extrusão para a superfície do cadáver do hospedeiro e (8) fotografia dos conidióforos e da produção de conídios no cadáver do carrapato. CO – conídio; GT – tubo germinativo; AP – apressório; H- hifa.

A cutícula do inseto constitui uma barreira a ser transposta. É formada de três camadas básicas: epicutícula, procutícula e a epiderme (Juárez & Fernández, 2007). Logo que há o reconhecimento da superfície pelo fungo, ocorre a secreção de uma substância micilaginosa, cuja principal função seria auxiliar na adesão do conídio (Zacharuk, 1971), posteriormente identificada como secreção de proteínas chamadas adesinas. Nesta fase, a produção destas proteínas do tipo MAD1 também é essencial para a adesão, uma vez que mutantes nulos para o gene *mad1*, que codifica adesinas, são incapazes de realizar a aderência à superfície de hospedeiros, além de terem a germinação retardada e não formarem blastosporos (Wang & St Leger, 2007).

Como a superfície da epicutícula é composta primariamente de lipídios e ceras, ela torna-se extremamente recalcitrante a danos físicos e impede o acesso de hidrolases à cutícula propriamente dita (Hadley, 1981). A secreção de lipases foi demonstrada em *Metarhizium* em condições que simulam a infecção dos hospedeiros (Silva, *et al.*, 2004) e é possível que estas enzimas rompam a camada hidrofóbica de ceras e permitam o acesso de outras hidrolases diretamente sobre a matriz composta por quitina e proteínas da procutícula. Dentro deste panorama, podemos dividir a fase de adesão em três etapas: (1) adsorção dos propágulos do fungo na superfície cuticular; (2) adesão de conídios pré-germinantes na epicutícula e (3) germinação do fungo e desenvolvimento sobre a cutícula, até a formação de apressório para o início da fase de penetração.

Na superfície do esporo ainda não germinado, foi detectada a presença de enzimas como proteases, esterases e N-acetilglicosidases, que auxiliam na adesão e na aquisição preliminar de nutrientes, causando modificações

superficiais na cutícula do hospedeiro (St Leger, *et al.*, 1990). Estes esporos germinam sobre o inseto produzindo um tubo germinativo, que, na extremidade, se modifica formando o apressório. *M. anisopliae* pode desenvolver o apressório *in vitro* ou *in vivo*, sendo influenciado pela superfície topográfica e por superfícies hidrofóbicas duras (St Leger, *et al.*, 1991, Hunter, *et al.*, 2001). O apressório acumula açúcares, sendo responsável pela geração de pressão osmótica necessária para a penetração (Wang & St Leger, 2007). Recentemente, foram demonstrados pelo menos quatro sinais diferentes que afetam a formação do apressório: (i) a fração polar da cutícula do hospedeiro, (ii) os níveis de nutrientes, (iii) a superfície hidrofóbica, e (iv) sinais ainda desconhecidos resultantes da carapaça do hospedeiro (Wang, *et al.*, 2005). Após a formação do apressório, desenvolvem-se os grampos de penetração, que são caracterizados por uma alteração na parede celular da porção do apressório que está em contato com o hospedeiro, sendo mais fina e saliente (St Leger, *et al.*, 1991, Clarkson & Charnley, 1996).

Após transpor a cutícula, há um espessamento das hifas e a formação de blastosporos responsáveis pela nutrição do fungo com a degradação das fontes de carbono da hemolinfa dos hospedeiros. Com o desenvolvimento do fungo, toxinas, ácidos cítrico e oxálico, são secretados (Bidochka, *et al.*, 1997).

Após a penetração, inicia-se o processo de colonização. As hifas germinam, sofrem um engrossamento, ramificam-se e desenvolvem-se como blastosporos na hemocele. O fungo coloniza a cavidade interna do corpo do hospedeiro e produz metabólitos secundários, como ácidos orgânicos e toxinas ciclodepsipeptídicas, conhecidas como destruxinas (DTX) que vão pronunciar o processo patogênico. Foram descritos diferentes tipos de DTX: A, B, C, D e E,

e outras 27 variantes (Wang, *et al.*, 2003), as quais causam paralisia muscular e inibição da função de hemócitos e túbulos de Malpighi além da supressão do sistema imune do hospedeiro (Bidochka, *et al.*, 1997, Pal, *et al.*, 2007).

As destruxinas, encontradas em *M. anisopliae* podem variar de acordo com o substrato utilizado pelo fungo. O tempo de colonização pode variar, dependendo do hospedeiro e das condições ambientais (Hsiao & Ko, 2001, Wang, *et al.*, 2003). Os sintomas causados pela patogenia sobre o hospedeiro são perda da sensibilidade, descoordenação dos movimentos e paralisia, levando-o à morte (Alves, 1998). Após a morte do hospedeiro, as hifas invadem órgãos internos e, com o esgotamento de nutrientes, se estendem para fora do tegumento. Sob condições ambientais apropriadas, ocorre a produção de esporos de coloração verde oliva que poderão ser disseminados pelo vento para infectar outros indivíduos (Alves, 1998).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar funções alternativas da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) em *Metarhizium anisopliae*.

3.2 Objetivos específicos

- Localizar a proteína GAPDH em diferentes tipos celulares do fungo.
- Analisar o padrão de expressão, transcritos do gene *gpdh1* e da proteína GAPDH de *M. anisopliae*, frente a diferentes fontes de carbono, incluindo o componente majoritário do exoesqueleto dos artrópodes, a quitina, e o próprio exoesqueleto.
- Avaliar a participação de GAPDH na adesão de conídios em asas de inseto.

4. METODOLOGIAS

4.1.2. Microrganismos utilizados

A linhagem E6 do fungo filamentososo *M. anisopliae* var. *anisopliae*, isolada a partir do cercopídeo *Deois flavopicta* no estado do Espírito Santo (cedida pelo Prof. João Lúcio de Azevedo - ESALQ/USP) e previamente caracterizada (Frazzon *et al.*, 2000) foi utilizada como linhagem selvagem (WT) neste trabalho. Esta linhagem não possui registros de utilização comercial e tem características de linhagem generalista, considerando a gama de hospedeiros a ela suscetível.

A linhagem XL1-Blue (Stratagene) de *Escherichia coli* foi utilizada para as manipulações de DNA de acordo com procedimentos padrão (SAMBROOK & RUSSEL 2001). Para a expressão de *gpdh1*, a linhagem BL21(DE3) pLys-S (Novagen) de *E. coli* foi utilizada de acordo com as recomendações do fabricante.

4.1.3. Manutenção da linhagem E6 de *M. anisopliae*

A linhagem E6 foi inoculada em meio MCc (anexo 1) sólido adicionado de 2% de solução de sais (anexo 1) e 0,04% de elementos traços (Ver anexo 1) a 28 °C até a esporulação (7-10 dias).

4.1.4. Suspensão de conídios e preparação de outros tipos celulares

Em placas de Petry contendo esporos, foram vertidos 3 mL de uma solução de Tween-80 (anexo 1). Com alça de Drigalsky, o fundo da placa foi

friccionado com o intuito de remover os conídios presentes e dispersá-los na solução adicionada. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, a suspensão foi transferida a um tubo do tipo *Falcon* estéril. O conteúdo foi, então, centrifugado a 4.000 g por 7 min. O sobrenadante foi descartado e água Milli-Q estéril foi adicionada, ressuspendendo os conídios, para a retirada do Tween-80 ainda presente. A suspensão foi centrifugada a 4.000 g por 7 min novamente. Descartou-se o sobrenadante e 2 mL de água Milli-Q estéril foram adicionados e conídios ressuspendidos com o auxílio de um *vortex*. A suspensão teve sua concentração determinada utilizando câmara de Neubauer e foi mantida a 4 °C por no máximo 14 dias.

Para a obtenção de conídios germinados, 10^6 conídios mL⁻¹ foram inoculados em meio MCc e incubados por 8 horas sob agitação a 28 °C. A obtenção de apressório foi realizada pela incubação de 5×10^5 conídios mL⁻¹ em placa de Petry sem agitação a 28 °C por um período entre 14 e 16 horas, em um meio contendo como única fonte de nutrientes 0,04 % de extrato de levedura. O micélio foi obtido por cultivo de conídios por 24 horas em meio MCc, 28 °C sob agitação. Os blastosporos foram obtidos por incubação em meio Adamek (1963) por 64 horas, seguido da filtragem com lã de vidro para remoção da porção micelial do cultivo. Os blastosporos tardiamente germinados foram obtidos por incubação da suspensão de blastosporos em meio MCc por 3 horas adicionais.

4.1.5. Preparação de células eletrocompetentes

Uma colônia das cepas XL1-Blue ou pLys-S de *E. coli* foi inoculada em 12 mL de meio LB líquido (anexo 1), contendo o antibiótico apropriado. O

frasco foi incubado em agitador de bancada por período *overnight* a 37 °C e 250 RPM. Deste pré-inóculo, 2,5 mL foram inoculados em frascos de 1.000 mL contendo 250 mL de meio LB líquido sem antibiótico. Os frascos foram mantidos em agitação constante a 37 °C e 250 RPM. A cada 30 min, a DO₆₀₀ foi checada até atingir valores entre 0,35 e 0,4 unidades de absorbância. Após, os frascos foram imediatamente incubados em gelo por 30 min. O cultivo contendo as células foi centrifugado e lavado 3 vezes em 100 mL de água Milli-Q estéril. Após, o total de células foi suspenso em 10 mL de glicerol (anexo 1) estéril e novamente centrifugado. Finalmente, as células foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 10% (v/v). Alíquotas de 40 µL foram dispostas em tubos Eppendorf de 0,5 mL, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C. As células foram transformadas por eletroporação conforme protocolos padrão (SAMBROOK & RUSSEL 2001), utilizando eletroporador da marca BIO-RAD.

4.1.7. Manipulação de ácidos nucleicos

Em todos os experimentos de hibridização de DNA, um fragmento de DNA previamente isolado, codificando GAPDH, foi utilizado como sonda (Dutra *et al.*, 2004). Para isso a biblioteca de cDNA, construída utilizando o *kit SuperScript Lambda System* para síntese de cDNA e clonagem em fago λ (GIBCO BRL), a partir de RNA poli(A+) isolado de *M. anisopliae* cultivado em meio suplementado com 1% de exoesqueleto de *Riphicephalus (Boophilus) microplus* (Dutra *et al.*, 2004), foi vasculhada usando o *kit Chemiluminescence (ECL) direct nucleic acid labeling and detection system* (Amersham Biosciences) de acordo com os procedimentos do manual do *kit*. *Primers* foram

projetados dentro da sequência parcial de *gpdh1* (GPDMACDS1, 5' TTGTCCGCTCTCTCCATATACAC 3'; GPDMACDS2, 5' TCCATTCGGTTACTCTCTTATTTTC 3') e utilizados em amplificações por RT-PCR e em amplificações usando DNA genômico, realizados de acordo com Sambrook e Russel (2001). Os amplicons foram clonados no vetor pUC18 para sequenciamento com o *kit DYEnamic ET Dye Terminator* no sistema MegaBace 1000 (Amersham Biosciences). Os contigs foram montados utilizando as ferramentas do *Staden package program* (Bonfield *et al.*, 1995; Bonfield and Staden, 1995). Para amplificação e clonagem da sequência do gene *gpdh1* em vetor de expressão, os seguintes *primers* foram utilizados: egpdhs 5' CCATGGCTCCCGTCAAGGTTGCCATC 3' e o primers egpdhas 5' CTCGAGCTTGCCAGCGTCAACCTTGGC 3'.

4.1.8 Alinhamento de sequências e análise filogenética

A sequência predita de resíduos de aminoácidos da proteína GAPDH de *M. anisopliae* foi alinhada utilizando ortólogos de várias outras espécies de fungos relacionadas utilizando o programa ClustalX 1.83 (Thompson *et al.*, 1997). As árvores filogenéticas foram construídas usando o programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA 4) (Tamura *et al.*, 2007), pelo método de *neighbor-joining* com *Poisson correction* e a confiabilidade foi avaliada por 10.000 replicações de *bootstrap*.

4.1.9 Extração de RNA e análise por *northern blot*

RNA total foi extraído segundo Dutra *et al.*, (2004). O RNA utilizado nos experimentos de *Northern blot* foi obtido pelo cultivo de *M. anisopliae*, em meio

tendo como única fonte de carbono ou glicose, ou glicerol ou etanol. Um cultivo inicial de 24 h foi realizado em meio MCc. As culturas foram coletadas e lavadas com água destilada estéril. O micélio foi então transferido para meio líquido com 0,6 % de NaNO₃ tendo como fonte de carbono ou 1 % (w/v) de glicose, ou 2 % (v/v) de glicerol ou 5 % (v/v) de etanol por 4 h sob agitação (150 RPM) a 28 °C.

Os RNAs totais, utilizados para os experimentos de *Northern blot*, foram extraídos de micélio cultivado em meio líquido, com 0,6 % (w/v) NaNO₃ suplementado com 1 % de quitina ou 1 % de exoesqueleto de *R. microplus*, a 28 °C por 48 h.

Aproximadamente 10 µg de RNA total foram separadas em gel de agarose 1,2 % contendo formaldeído e transferidas para filtros de *nylon* (Amersham Biosciences). Os filtros foram hibridizados com sondas radiomarcadas por [α -³²P] dNTP utilizando o protocolo de *Random priming*, como descrito em Sambrook e Russel (2001). Um clone de cDNA correspondente ao gene *gpdh1* de *M. anisopliae* foi usado como sonda. A normalização do RNA fracionado em gel foi feita usando as quantidades de RNA ribossômico visualizadas em gel corado com brometo de etídio. Os filtros hibridizados foram expostos ao *Screen Kodak-K* e a imagem digital da hibridização foi obtida utilizando o sistema *Pharos* (Bio-Rad). As comparações das intensidades das hibridizações foram calculadas utilizando o *software ImageJ* (Abramoff *et al.*, 2004).

4.1.10 Extração de proteínas miceliais totais

O micélio cultivado é inicialmente filtrado, e parte da água nele contida é removida por absorção em papel filtro. O micélio é então pulverizado em nitrogênio líquido e ressuspendido no tampão de extração Tris 100 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, TPCK 50 μ M e PMSF 1 mM. A proporção de uso é de 2 mL do tampão para cada 0,5 g de micélio pulverizado seco (ou parcialmente seco). A mistura é agitada por cerca de 10 minutos e centrifugada a 10000 g por 15 minutos. O sobrenadante é então recolhido e o *sedimento* é armazenado, novas frações de sobrenadante podem ser obtidas pelo mesmo procedimento.

A quantificação das proteínas foi realizada utilizando o método de Bradford e o sistema Q-bit (Invitrogen). A qualidade das proteínas foi verificada por SDS-PAGE 12,5 %.

4.1.11 Manipulação de proteínas: eletroforese e análise por *western blot*

Os extratos protéicos celulares foram preparados a partir de micélio cultivado inicialmente em meio MC por 24 h a 28 °C, o qual foi coletado, lavado com água destilada estéril e transferido para o meio de interesse por mais 6 h (1 % (w/v) de glicose, ou 2 % (v/v) de glicerol ou 5 % (v/v) de etanol).

Após a extração de proteínas, 2 mg foram precipitadas pela adição de 10 % (w/v) de ácido tricloroacético e os *sedimentos* foram lavados cinco vezes com 10 % (v/v) de acetona. As amostras foram ressuspendidas em 150 μ L de tampão de solubilização (uréia 7M / tio-uréia 2M / CHAPS 4 % / DTT 1% / anfólitos 0,2 % / *orange g* 0,05 %), incubadas por 1 hora à temperatura ambiente e centrifugadas por 45 minutos a 13000 g a 20 °C. O sobrenadante é

então coletado, evitando o *sedimento* formado ao máximo, e procede-se com a re-hidratação ativa da tira a ser isoeletrofocalizada (50 V / 16 horas / 20 °C), sem pausa entre a re-hidratação e o primeiro passo da isoeletrofocalização. Os passos seguintes de isoeletrofocalização são os seguintes:

S1: 500 V / 1 hora (passo de dessalinização)

S2: 10000 V / 3 horas (com subida lenta da voltagem)

S3: acumulação até 70000 V/H.

A focalização isoeétrica (IEF) foi realizada com tiras de 17 cm e pH 5-8 (Bio-Rad), e, após o procedimento, as tiras foram incubadas em tampão de equilíbrio (uréia 6 M / glicerol 30 % / SDS 2 % / Tris pH 8,8 375 mM / azul de bromofenol 0,05 %) inicialmente com DTT 1% por 15 minutos e ao término com iodoacetamida 4 % por mais 15 minutos. Ao término da IEF a segunda dimensão foi obtida em SDS-PAGE 12,5 %.

Nas análises por *western blot*, os extratos protéicos foram resolvidos em gel de eletroforese unidimensional e bidimensional. As proteínas foram eletroforeticamente transferidas para membrana de PVDF utilizando o sistema da BIO-RAD, e a transferência foi avaliada pelo método de coloração com vermelho de Ponceau S, a fim de determinar se quantidades equivalentes de amostra foram migradas e a fim de determinar a eficiência de transferência. A proteína GAPDH foi detectada utilizando o anti-soro policlonal gerado contra a proteína GAPDH recombinante de *Paracoccidioides brasiliensis* (Barbosa *et al.*, 2006) e, após a reação do anti-soro primário com proteína, o anti-soro contra a imunoglobulina G (IgG) de coelho conjugada à peroxidase foi utilizada para detecção indireta da hibridização. A revelação foi realizada usando o *kit GE*

developing western blot. O anti-soro anti GAPDH de *P. brasiliensis* foi cedido pela Professora Célia de Almeida Soares da Universidade Federal de Goiânia.

4.2.1 Determinação da sequência de resíduos de aminoácidos da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Amostras de extratos celulares foram fracionadas inicialmente por focalização isoeétrica com tiras de pH 5-8 e por SDS-PAGE 12,5 % e, após a segunda dimensão as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF, *overnight* a 100 mA. A banda de 36 kDa e pI 7.0 foi removida do gel, submetida à digestão com tripsina e à análise por espectrometria de massa (LC-MS/MS). A sequência de aminoácidos foi obtida por análise no programa Mascot usando os seguintes parâmetros: carbamidometilação como modificações fixas, oxidação como modificações variáveis, $\pm 0,1$ Da de tolerância de peptídeos, $\pm 0,1$ Da de tolerância MS/MS; cargas dos peptídeos +1, +2 e +3, monoisotópico, usando o banco de dados NCBI nr.

4.2.2 Detecção da proteína GAPDH por microscopia de fluorescência e microscopia confocal

Conídios foram obtidos da suspensão de esporos derivados de cultivos de 10 dias em placas de Petry. Conídios germinados foram obtidos do cultivo destes em meio MCc por 8 horas a 28 °C sob agitação. Apressórios foram isolados de cultivos de 16 h em lamínulas em meio tendo como única fonte de nutrientes 0,04 % extrato de levedura. Micélio foi cultivado em meio MC a 28 °C por 24h. Blastosporos foram isolados de culturas em meio Adamek (Adamek,

1963) a 28 °C por 64 h e, após isso, 3 h de cultivo em MC foi usado para obter blastosporos germinados tardiamente.

Todos os tipos celulares acima descritos foram fixadas *overnight* a 4 °C em 3,7 % de formaldeído / 50 mM de PIPES (pH 6,7) / 5 mM MgSO₄ / 25 mM de EDTA (pH 7,0). Após a fixação, as amostras foram lavadas 5 vezes em tampão PEM (anexo 1). Antes do tratamento com os anti-soros primários, as lamínulas foram incubadas em 500 µL de tampão de bloqueio (BSA 2,5 % / leite em pó desnatado 1% / soro fetal bovino inativado 8 %) por 1 hora a 37 °C. Após o bloqueio, as células foram lavadas 3 vezes com PBS / Tween 20 0,5 % e então incubadas com o anti-GAPDH em uma diluição de 1:100 por 1 h a 37 °C feita em PBS / BSA 3%. Após este passo, as células foram lavadas novamente por 3 vezes em PBS / Tween 20 0,5 % e incubadas com o anti-soro contra a imunoglobulina G (IgG) de coelho conjugada à FITC em uma diluição de 1:50 por 1h a 37 °C. Ao término da incubação, as amostras foram lavadas 3 vezes em PBS / BSA 3 %. Nesta fase, corantes, como *CalcoFluor White* (marcador de quitina) ou DAPI (marcador de núcleos), puderam ser utilizados.

A marcação com o corante FM4-64 (marcador de vesículas) foi feita exclusivamente com células vivas, pois a internalização ocorre por endocitose. Para isto, conídios recém coletados foram incubados com 10 µg/mL de FM4-64 a 37 °C por 30 minutos e, ao término da incubação, os mesmos foram lavados 3 vezes com PBS 1X e incubados por mais 1 hora a 37 °C.

As lâminas foram montadas com VectaShield e seladas com esmalte. A observação foi realizada tanto em microscópio de fluorescência Carl Zeiss sob objetiva de 100x assim com no microscópio confocal Olympus FluoView 1000 hospedado no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME-UFRGS).

As imagens oriundas da microscopia confocal foram processadas utilizando o programa da *Olympus FluView10 viewer* em associação aos programas Image J e Voxx.

4.2.3 Atividade enzimática e fluorescência de conídios imunomarcados com GAPDH

A atividade de GAPDH foi medida espectrofotometricamente a 340 nm pelo aumento da absorbância devido à formação de NADH. Para determinar a atividade enzimática de GAPDH na superfície externa dos conídios, extratos de proteínas ligadas à superfície da célula foram obtidos como descrito em Silva *et al.*, (2009). Uma suspensão de conídios foi agitada por 5 minutos em tampão contendo Tris pH 8,0 50mM / Triton X-100 0,25 % em uma proporção de 2,5 mL de tampão para cada 1 grama de conídio, após agitação, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante filtrado em filtro 0,22 µm. A integridade dos conídios foi confirmada por microscopia e a atividade enzimática das proteínas GAPDH da superfície das células foi medida em um ensaio de 20 min. A medida de fluorescência quantitativa das proteínas GAPDH marcadas nos conídios também foi obtida. Para isto, 10^8 conídios íntegros e lisados foram incubados com anti-soro anti-GAPDH na diluição de 1:100 por 1h e, logo após, foram incubados com o anti-soro contra a imunoglobulina G (IgG) de coelho conjugada à FITC em uma diluição de 1:50 por 1 h. A fluorescência a 525 nm foi medida em um leitor de microplaca Spectramax M2^e (Molecular Devices). Conídios macerados com nitrogênio líquido foram utilizados como controle intracelular e extracelular da proteína GAPDH. Conídios sem imunomarcção foram utilizados como controle negativo.

4.3 Ensaio de adesão

Suspensão de conídios de *M. anisopliae* selvagem (2×10^7 conídios/mL), expressando GFP, foram utilizados para tratar asas de insetos em imersões de 20 segundos (a expressão de GFP tem como funcionalidade exclusiva facilitar a visualização sob o microscópio de fluorescência, uma vez que a estrutura heterogênea da asa dos insetos torna muito difícil a visualização dos conídios sob o campo claro, pois a espessura da asa apresenta diferentes profundidades de observação, o que é incompatível com a fotodocumentação do campo observado. As asas foram colocadas na superfície de ágar água 0,7 % e incubadas por 8 h a 28 °C para induzir a germinação das células. Os conídios foram contados em cinco campos diferentes de cada asa utilizando microscópio de fluorescência em objetiva de 20x, com três réplicas (fotos de cada campo foram capturadas e posteriormente analisadas com o auxílio do programa Image J). Os conídios foram contados antes e após lavagem com 0,05 % de tween 20 por 30 segundos. As asas utilizadas foram de *Dysdercus peruvianus* e foram desinfestadas em H₂O₂ a 37 % por 5 min e lavadas duas vezes em água destilada estéril. Os seguintes tratamentos foram realizados: (i) antes da imersão das asas na suspensão de conídios foi feita a pré incubação das mesmas em BSA (25 µg/mL) por 1 h a 37 °C e pré incubação com GAPDH recombinante (25 µg/mL, de *M. anisopliae*) por 1 hora a 37 °C; (ii) a suspensão de conídios foi tratada antes da imersão das asas com anti-soro policlonal anti-CHI2 (anti-soro controle, encontrado na superfície das células de *M. anisopliae*, 1:100) por 1 h a 37 °C e anti-GAPDH (1:100). Os experimentos foram realizados em triplicatas, a média e o erro padrão foram determinados. A

análise estatística foi feita utilizando o teste t. Valores de *P* de 0,0001 ou menores foram considerados estatisticamente significantes.

4.4.1 Expressão heteróloga de GAPDH

Após amplificação do gene *gpdh1* de *M. anisopliae* utilizando os *primers* *egpdhs* e *egpdhas*, exclusivos para a expressão da proteína, o amplicom foi clonado no vetor pUC18 e sub-clonado no vetor de expressão pET-32b(+) gerando o plasmídeo pET-32b(+):GAPDH (construção esta na qual estaria contido então o gene que codifica a proteína GAPDH de *M. anisopliae*). A linhagem de *E. coli* BL21 pLysS, foi transformada com o plasmídeo construído e foi cultivada em meio LB adicionado de ampicilina (100 µg/mL) a 37 °C até atingir DO₆₀₀ de 1. A expressão foi induzida por IPTG (concentração final de 1 mM) e após 3 h de indução, as células foram coletadas por centrifugação e ressuspendidas no tampão de lavagem utilizado na purificação (50 mM NaH PO / 300 mM NaCl/ 20 mM imidazol). As células foram lisadas por incubação com lisozima (1 mg/mL) por 30 min e por sonicação (seis *rounds* de 10s a 200-300 W com um intervalo de resfriamento a 4 °C de 10 segundos). Após a lise celular, os *debris* foram separados por centrifugação e o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtros de 0.45 µm. A proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando resina Ni-NTA (QIAGEN). Após adsorção da proteína à resina, a mesma foi lavada com tampão de lavagem e as frações eluídas foram obtidas pela lavagem com tampão de eluição (50 mM NaH PO / 300 mM NaCl / 250 mM imidazol). A fração com maior grau de pureza foi avaliada por SDS-PAGE. Em todas as purificações, foi feita a comparação do extrato bacteriano antes e após a indução por IPTG, assim

como a determinação da fração majoritária na qual a proteína expressa se encontrava, a fração solúvel ou a fração insolúvel.

4.4.2 Produção de anti-soro

Após a purificação da proteína recombinante (ver item 4.1), 100 µg da proteína foram misturadas ao adjuvante completo de Freund e a mistura foi inoculada em cinco camundongos fêmea da linhagem Balbc, na cavidade peritoneal. O adjuvante completo de Freund foi utilizado apenas na primeira inoculação, nas restantes o adjuvante incompleto foi utilizado. Os inóculos foram feitos com intervalos de 15 dias entre cada, num total de 6 inóculos. A partir da terceira inoculação, o soro dos animais foi testado quanto à especificidade, por *western blot*, contra a proteína GAPDH recombinante, sendo este o critério de decisão de interrupção dos inóculos. Com o término das inoculações, os animais tiveram o sangue coletado. O sangue coletado foi incubado por 1 hora a 37 °C, centrifugado por 10 minutos a 10000 g a 4 °C e o sobrenadante armazenado a - 20 ° C.

5. RESULTADOS

5.1 Clonagem molecular e análise do gene *gpdh1* de *M. anisopliae*

Durante a procura por sequências diferencialmente expressas em *M. anisopliae* em condição que simulavam a infecção (meio de cultivo contendo exoesqueleto do carrapato *R. microplus*), dentre as várias sequências encontradas estava uma sequência de 600 pb com identidade ao gene que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de outros fungos filamentosos relacionados (Dutra *et al.*, 2004). O fragmento de DNA foi então utilizado como sonda em um experimento de *Southern blot*, que revelou a presença de uma única cópia do gene no genoma de *M. anisopliae* (FIGURA 5).

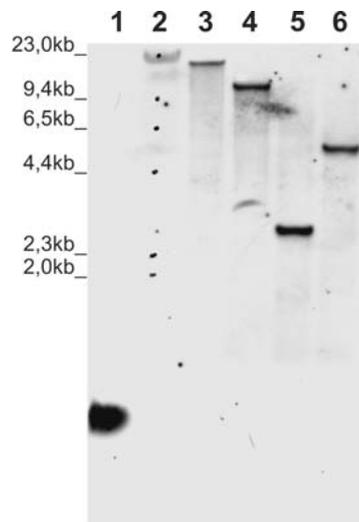


FIGURA 5. Número de cópias do gene *gpdh1*. Análise por *Southern blot* do DNA genômico de *M. anisopliae* mostrando uma única cópia do gene. O DNA foi digerido com BamHI (canaleta 3), EcoRI (canaleta 4), PstI (canaleta 5) e Sall (canaleta 6). Um fragmento de 600 pb codificando GAPDH foi utilizado como sonda e foi utilizado como controle positivo (canaleta 1), o marcador e os respectivos tamanhos moleculares estão na canaleta 2).

Com o intuito de caracterizar completamente o gene *gpdh1* de *M. anisopliae*, clones foram isolados utilizando para isso a sequência acima descrita de 600 pb. O cDNA isolado foi utilizado para projetar *primers* 5' e 3' para amplificação completa do gene *gpdh1*, codificando GAPDH. Os amplicons genômico e de cDNA, com tamanhos de 1,2 kb e 1,4 kb respectivamente, foram clonados no vetor pUC18, sequenciados e as sequências montadas em contigs. A diferença de tamanho entre ambos é referente à presença de um íntron que se estende do nucleotídeo 173 até o nucleotídeo 387 (~200 pb).

Partindo desta sequência de 600 pb codificando a enzima GAPDH de *M. anisopliae*, clones de uma biblioteca de cDNA foram isolados, e o gene completo foi clonado em pUC18. A ORF de *gpdh1* foi depositada no GenBank sob o número de acesso EF050456 e codifica uma proteína com 338 resíduos de aminoácidos, com massa e *pI* teórico estimados de 36 kDa e 8,26, respectivamente. A análise *in silico* por domínios revelou apenas os domínios de ligação a NAD (Val4 à Cys151) e o domínio carboxi terminal (Leu156 a Tyr313), já esperados e típicos de GAPDH (FIGURA 6). A sequência de resíduos de aminoácidos de GAPDH de *M. anisopliae* apresentou alta identidade e similaridade com seus ortólogos em fungos relacionados (TABELA 1). Com base nisto, uma árvore filogenética foi construída (FIGURA 7), mostrando a distribuição consistente com a encontrada na literatura para seus ortólogos (Jungehulsing *et al.*, 1994; Ridder and Osiewacz 1992; Templeton *et al.*, 1992).

TABELA 2. Valores de identidade e similaridade (substituições conservativas) do alinhamento de seqüências preditas de resíduos de aminoácidos de GAPDH de *M. anisopliae* com ortólogos de fungos relacionados e *E. coli* (como *outgroup*).

Microrganismos	Identidade	Similaridade
<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 cifferri</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%

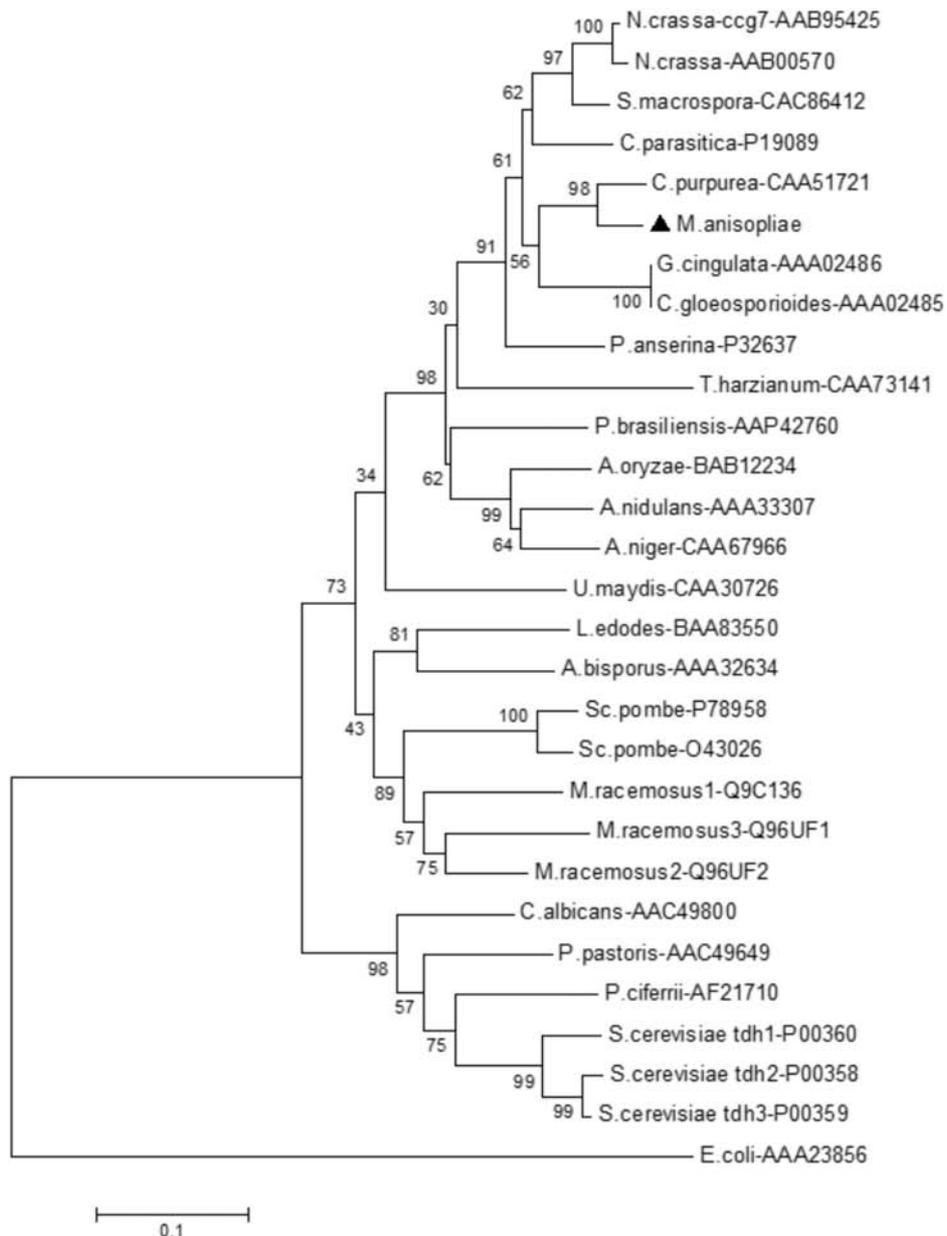


FIGURA 7. Árvore filogenética de ortólogos de GAPDH. A sequência deduzida de aminoácidos do gene *gpdh1* de *M. anisopliae* foi utilizada para a construção de uma árvore filogenética pelo método de *neighbor-joining*, e a posição do gene *gpdh1* pode ser visto em comparação aos ortólogos em fungos relacionados (o número de acesso no GenBank de cada gene está ao lado de cada uma das espécies). O grau de confiança foi confirmado por 10000 replicações; a barra representa o número de substituições por nucleotídeo. A sequência de resíduos de aminoácidos de *M. anisopliae* está marcada por um triângulo.

5.2 Identificação da proteína GAPDH de *M. anisopliae*

Com a finalidade de caracterizar possíveis isoformas de GAPDH em *M. anisopliae*, extratos celulares foram isoeletrofocalizados em tiras de pH 5-8 e analisados por SDS-PAGE (FIGURA 8, painel a). A imunodetecção de isoformas da proteína GAPDH nativa foi realizada utilizando o anti-soro policlonal anti-GAPDH de *P. brasiliensis*. O resultado do *Western blot* revelou três formas reativas, com pls de 6,6; 6,8 e 7,0 (FIGURA 8, painel b).

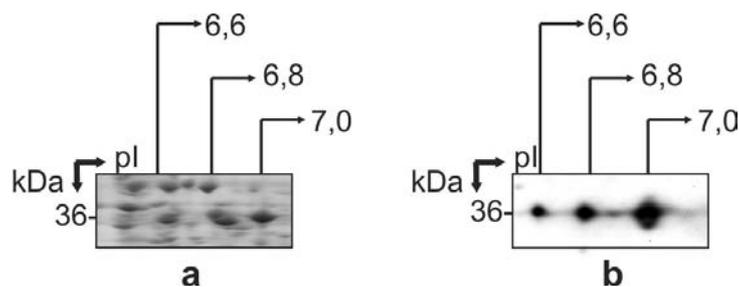


FIGURA 8. Caracterização de isoformas de GAPDH de *M. anisopliae*. Painel (a) mostra SDS-PAGE corado com azul de Coomassie e o painel (b) mostra a reatividade do extrato contra o anti-soro contra GAPDH de *P. brasiliensis* (1:2000).

Uma das três proteínas majoritárias com massa molecular de 36 kDa e pI de 7,0 foi removida do gel 2-D, o qual foi migrado com extrato de proteínas miceliais de *M. anisopliae*, e submetida a identificação em espectrofotômetro de massas. A sequência de resíduos de aminoácidos de peptídeos internos com um alto *protein score* (derivado do *ion score* -1326), para GAPDH predita de *M. anisopliae* apresentou cobertura de 67 % da sequência predita e foi

obtida por análise utilizando o programa Mascot (TABELA 2 e FIGURA 9). Este resultado confirma a especificidade do anti-soro policlonal anti-GAPDH de *P. brasiliensis* contra GAPDH de *M. anisopliae*, e identifica a banda como sendo uma isoforma de GAPDH de *M. anisopliae*. Entretanto, as outras duas prováveis isoformas (pls de 6,6 e 6,8) não puderam ser isoladas em quantidades suficientes para a identificação, o que nos leva a considerá-las apenas em suas possíveis identificações positivas como isoformas.

```

1  MAPVKVGING  FGRIGRIVFR  NAAEHPEIEV  VAVNDPFIDT  EYAAYMLKYD
51  SSHGIFKEDI  KKEADGLVFN  GKVKVFFTER  DPSAIPWKSA  GAELYVESTG
101 VFTTTDKAKA  HLAGGAKKVV  ISAPSADAPM  YVMGVNEKTY  DGKADVISNA
151 SCTTNCLAPL  AKVIHDKFTI  VEGLMTTVHS  YTATQKTVDG  PSGKDWRGGR
201 GAAQNIIPSS  TGAAKAVGKV  IPDLNGKLTG  MSMRVPTANV  SVDLTARIE
251 KGASYDEIKE  AIKEAANGPL  KGILAYTEDD  VVSSDMNGNT  NSSIFDAKAG
301 ISLNKNEVKL  VSWYDNEWGY  SRRVLDLLAY  IAKVDAGK

```

Figura 9. Cobertura dos peptídeos identificados na sequência predita de resíduos de aminoácidos de GAPDH de *M. anisopliae*. Os peptídeos identificados estão marcados em vermelho.

TABELA 3. Sequência de resíduos de aminoácidos de peptídeos internos de uma proteína com massa molecular de 36 kDa e pI de 7,0, com alto score para GAPDH de *M. anisopliae* (ABK40074 número de acesso no NCBI) isolada de 2D-SDS-PAGE de extrato protéico de *M. anisopliae*.

Sequência do peptídeo	Observado ^a	Mr (expt) ^b	Mr (calc) ^c	Delta ^d	Miss ^e	Score ^f	Esperado ^g	Rank ^h
NAAEHPEIEVAVNDPFIDTEYAAFMLK	1055,8263	3164,4571	3164,5012	-0,0041	0	29	1,5	1
GILAYTEDDVSSDMNGNTNSSIFDAK	1440,1415	2878,2684	2878,2815	-0,0130	0	128	1,6e-10	1
FTIVEGLMTTVHSYTATQK	715,0166	2142,0280	2142,0667	-0,0388	0	(42)	0,21	1
VVISAPSADAPMYVMGVNEK	1055,4679	2108,9212	2109,0122	-0,0910	0	(93)	9e-07	1
SAGAEYIVESTGVFTTTDK	988,4499	1974,8852	1974,9422	-0,0570	0	127	5,5e-10	1
LVSWYDNEWGYSR	837,8727	1673,7308	1673,7474	-0,0166	0	(67)	0,00053	1
VPTANVSVDLTAR	721,4022	1440,7898	1440,7937	-0,0038	0	(115)	1,6e-08	1
GASYDEIKEAIK	662,3236	1322,6326	1322,6718	-0,0391	1	103	3,3e-07	1
VLDLLAYIAK	559,8319	1117,6492	1117,6747	-0,0254	0	68	0,00092	1

^a Valor experimental m/z

^b Valor experimental m/z transformado para massa molecular relativa.

^c Massa molecular relativa calculada dos peptídeos encontrados.

^d Erro entre a massa experimental e a massa calculada.

^e Número de sítios de clivagem errados.

^f Ions score.

^g Valor esperado para o peptídeo encontrado.

^h Rank dos ions encontrados, (1 a 10, onde 1 é o melhor valor encontrado).

5.3 Regulação fisiológica do gene *gpdh1* e da proteína cognata de *M. anisopliae*

O padrão transcricional do gene *gpdh1* de *M. anisopliae* em resposta à diferentes fontes de carbono (glicose, glicerol ou etanol como única fonte de carbono) foi analisado por *Northern blot*, utilizando como sonda um fragmento de cDNA de *gpdh1* radiomarcado. Os níveis de transcritos de *gpdh1* foram expressivamente reduzidos na presença de glicerol e de etanol quando comparados à glicose (FIGURA 10A). Os níveis da proteína cognata foram analisados por imunodeteção utilizando gel de poliacrilamida uni e bidimensional de extratos de proteínas de cultivos utilizando as mesmas fontes de carbono (FIGURA 10B, 10C, 10D e 10E). De maneira semelhante, houve uma diminuição da acumulação da proteína GAPDH quando o fungo foi cultivado em presença de glicerol e etanol, quando comparado ao cultivo em glicose. Tanto o padrão traducional quanto o padrão transcricional se mostraram responsivos aos diferentes substratos aos quais *M. anisopliae* foi submetido durante os cultivos. Os transcritos do gene *gpdh1*, oriundos do cultivo de *M. anisopliae* cultivado em um meio contendo exoesqueleto de carrapato ou quitina como fonte única de carbono, também foram analisados (FIGURA 11), e demonstraram uma diminuição significativa dos transcritos de *gpdh1* em meio contendo quitina quando comparado aos meios contendo glicose ou exoesqueleto.

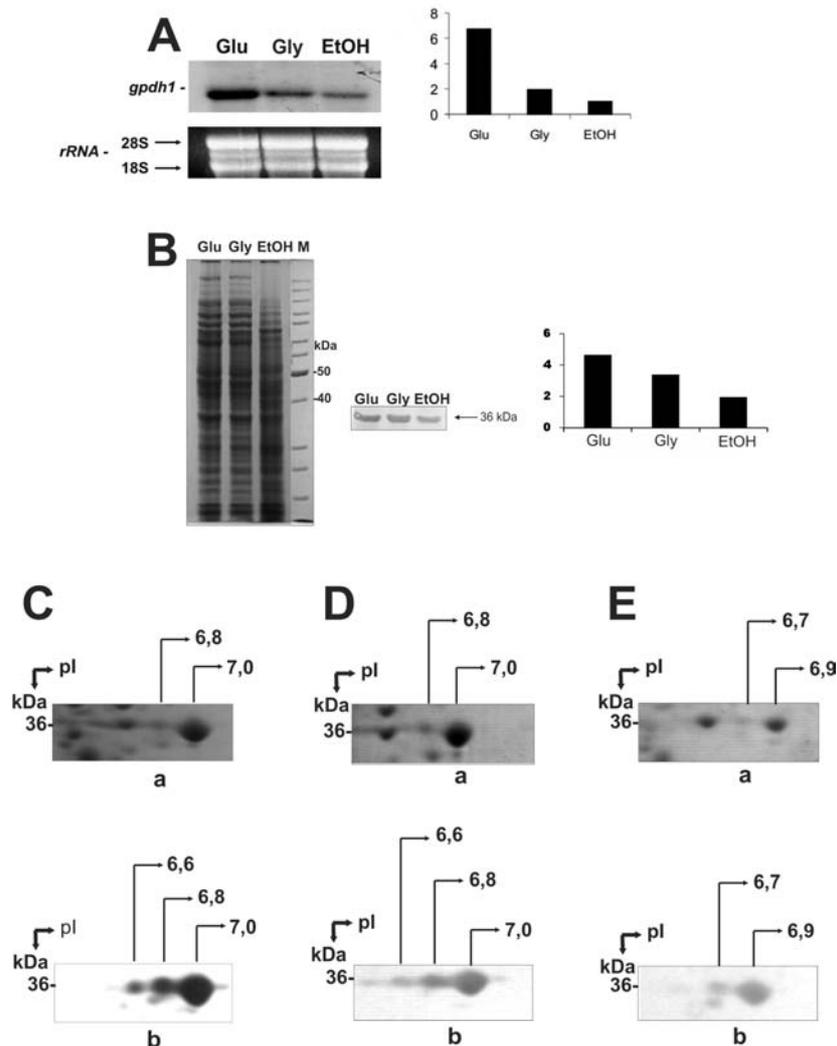


FIGURA 10. Padrão de expressão da proteína GAPDH durante o desenvolvimento de *M. anisopliae* em condições fisiológicas. (A) Análise por *Northern blot* dos transcritos do gene *gpdh1* oriundo de micélio cultivado em meio contendo glicose (Glu), glicerol (Gly) ou etanol (EtOH). (A) O painel superior mostra a hibridização de transcritos e o painel inferior o carregamento com RNA ribossômico. (B) Análise por *western blot* de extrato protéico sob as mesmas condições acima mencionadas. O painel da esquerda mostra o SDS-PAGE corado azul de *Coomassie* e o painel da direita, a reatividade do extrato protéico frente o anti-soro contra GAPDH de *P. brasiliensis*, onde a canaleta 1 representa a condição com glicose, a canaleta 2, a condição com glicerol e a canaleta 3, a condição com etanol. O M representa o marcador de massa molecular. O histograma foi estabelecido por análise densitométrica utilizando o programa Image J. (C) SDS-PAGE bidimensional de extratos de *M. anisopliae* cultivados em meio contendo glicose, (D) SDS-PAGE bidimensional de extratos de *M. anisopliae* cultivados em meio contendo glicerol, (E) SDS-PAGE bidimensional de extratos de *M. anisopliae* cultivados em meio contendo etanol. O painel (a) mostra o SDS-PAGE corado com *Coomassie*, enquanto o painel (b) mostra a reatividade contra o anti-soro.

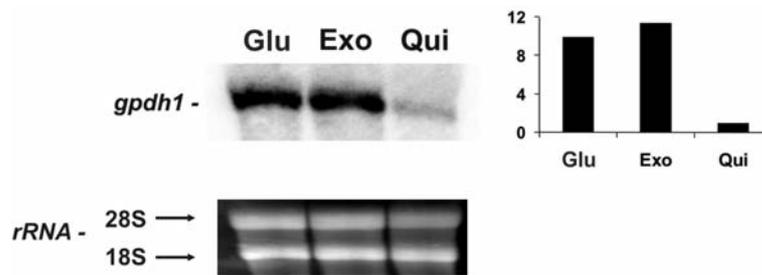


FIGURA 11. Padrão de expressão dos transcritos de *gpdh1* de *M. anisopliae*. Análise por *northern blot* dos transcritos de GAPDH de micélio cultivado em meio contendo glicose (glu), exoequeleto de carrapato (Exo) ou quitina (Qui). O painel superior mostra a hibridização, o painel inferior, o carregamento com RNA ribossômico. O histograma foi estabelecido por análise densitométrica utilizando o programa Image J.

5.4 Produção e purificação da proteína GAPDH recombinante

Mesmo já possuindo o anti-soro anti GAPDH cedido pela Prof. Célia Soares, e já tendo realizado uma série de experimentos com o mesmo, decidimos proceder com a expressão da proteína recombinante em *E. coli*, pois acreditávamos que o uso da proteína GAPDH recombinante seria inevitável em algum passo futuro do projeto e já estávamos decididos a gerar o anti-soro homólogo de qualquer maneira. Para isso, realizamos inicialmente a amplificação do fragmento de 1,2 kb, obtido que foi amplificado a partir do molde de cDNA de *M. anisopliae* com o uso dos *primers* *egpdhs* e *egpdhas*, que confeririam ao produto de PCR os sítios de clivagem para as enzimas NcoI (extremidade 5') e XhoI (extremidade 3'). O produto gerado foi clonado no vetor pUC18, excisado com as respectivas enzimas de restrição NcoI e XhoI, e subclonado no vetor de expressão pET-32b(+). A construção pôde então ser transformada por eletroporação na linhagem de *E. coli* BL21 pLysS para indução da expressão heteróloga da proteína GAPDH conforme o item 4.1. Para a indução 1 mM de IPTG foi utilizado em uma cultura com 3 horas de cultivo à 37 °C e mantida por mais 3 horas de indução (uma alíquota de 1 mL foi coletada para comparação antes e após a indução com IPTG).

A suspensão de células bacterianas resultantes foi centrifugada e ressuspendida em um pequeno volume (entre 3 e 5 mL) do tampão de lavagem da resina de cromatografia. Uma alíquota de 1 mL foi coletada, fervida por 10 minutos e centrifugada a 14000 g por 5 minutos. O *sedimento* resultante foi ressuspendido em 20 µL de tampão de amostra para SDS-PAGE, fervido por 3 minutos e novamente centrifugado. Após isto, 20 µL do sobrenadante foram aplicados (fração solúvel da amostra) e o *sedimento* restante foi ressuspendido

em 20 μ L de tampão de amostra e aplicado em gel (fração insolúvel da amostra). Estas amostras foram comparadas ao perfil eletroforético de proteínas de *E. coli* sem indução de expressão (FIGURA 12A). Cerca de 90 % da proteína recombinante pôde ser detectada na fração solúvel, a banda de expressão heteróloga era compatível com a massa molecular esperada para GAPDH predita, assim como era inexistente no extrato bacteriano, e ainda, em termos quantitativos, estava sendo expressa em altas quantidades.

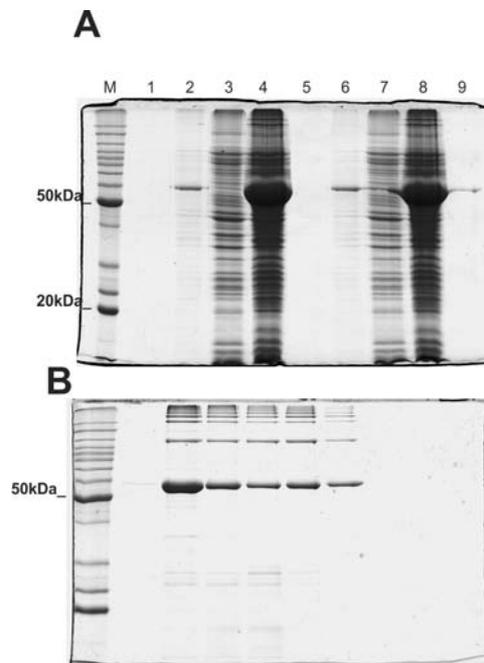


FIGURA 12. Expressão heteróloga de GAPDH em *E. coli*. (A) Indução da expressão em *E. coli*: M- marcador, 1- fração insolúvel (*sedimento*) não induzido, 2- fração insolúvel (*sedimento*) induzido (1mM IPTG), 3- fração solúvel (sobrenadante) não induzido, 4- fração solúvel (sobrenadante) induzido (1mM IPTG), 5- fração insolúvel (*sedimento*) não induzido, 6- fração insolúvel (*sedimento*) induzido (0,5mM IPTG), 7- fração solúvel (sobrenadante) não induzido, 8- fração solúvel (sobrenadante) induzido (0,5 mM IPTG). (B) Frações eluídas após purificação em coluna de afinidade.

A suspensão de células ressuspensa no tampão de lavagem foi então lisada por incubação com lisozima e sonicação como descritos na metodologia, e se procedeu com a purificação em resina carregada com níquel, por gravidade somente. Foram realizadas 8 lavagens com 1 mL do tampão de lavagem e a proteína foi eluída em 4 frações de 0,5 mL com o tampão de eluição (FIGURA 12B). As frações mais concentradas foram escolhidas para o procedimento de imunização dos animais e tratamento de asas de *Dysdercus peruvianus* com a proteína GAPDH recombinante.

5.5 Geração de anti-soro em camundongos

As frações mais concentradas oriundas da purificação da proteína GAPDH recombinante foram escolhidas para serem inoculadas nos camundongos, cinco fêmeas Balbc. Apenas com o término da sexta inoculação que se alcançou título suficiente do anti-soro para proceder com a coleta do sangue dos animais (FIGURA 13).

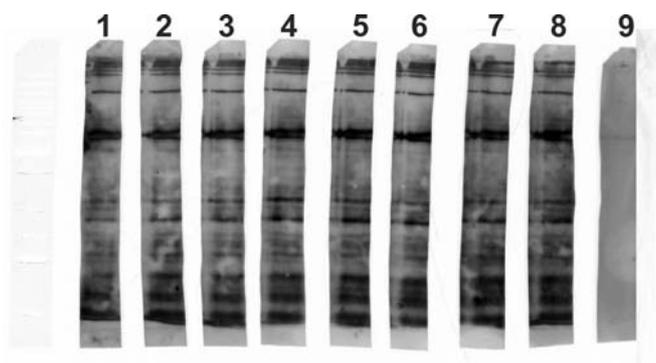


FIGURA 13. Titulação do anti-soro contra GAPDH de *M. anisopliae*. Canaleta 1: animal 1 (1:750); canaleta 2: animal 1 (1:1000); canaleta 3: animal 2 (1:750); canaleta 4: animal 2 (1:1000); canaleta 5: animal 3 (1:750); canaleta 6: animal 3 (1:1000); canaleta 7: animal 4 (1:750); canaleta 8: animal 5 (1:750) e canaleta 9: soro recolhido antes do início imunização.

O elevado número de otimizações e experimentos que haviam sido realizados com o anti-soro cedido pela Prof. Célia de Almeida Soares e um revés na geração terceirizada do anti-soro anti GAPDH (que nós custou cerca de 6 meses), acabaram desencorajando o uso do anti-soro gerado por nós. Além disso, algum procedimento de limpeza deveria ser realizado no soro homólogo (como por exemplo, adsorção em extrato bacteriano) e, portanto, mais tempo seria necessário.

5.6 *Western blot* de extratos de proteínas de superfície de conídios

Com o objetivo de localizar a proteína GAPDH na superfície dos conídios de *M. anisopliae*, experimentos iniciais foram realizados utilizando extratos protéicos da superfície de conídios. Um dos primeiros testes foi realizado utilizando somente PBS 1X como tampão para a agitação e remoção de proteínas ligadas fracamente à superfície do conídio. O protocolo mais eficiente para remoção de tais proteínas, entretanto, foi o descrito por Silva *et al.*, (2009) (descrito na metodologia). Contudo, a detecção da proteína por *western blot* se mostrou pouco clara, mesmo quando quantidade altas de extrato eram utilizadas (FIGURA 14). Logo, percebemos que outra abordagem se fazia necessária.

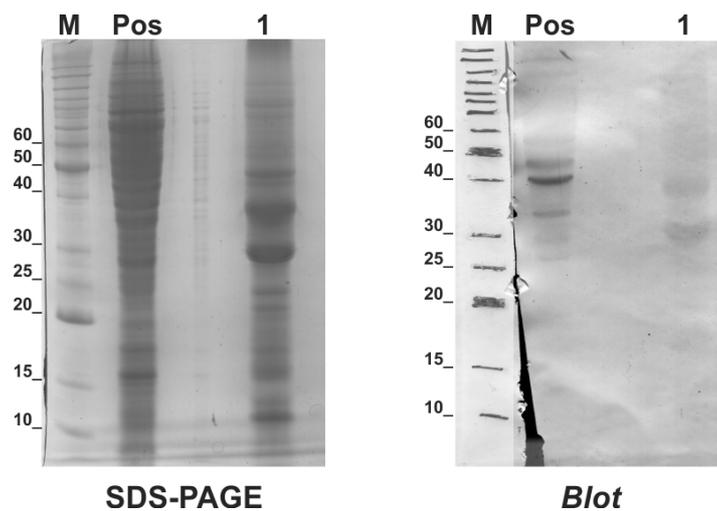


FIGURA 14. Análise da presença de GAPDH em extratos de proteínas da superfície celular de conídios. Análise por *western blot* de extratos protéicos da superfície de conídios de *M. anisopliae* utilizando o anti-soro contra GAPDH de *P. brasiliensis*. As canaletas estão identificadas como M- marcador de massa molecular; Pos- controle positivo (180 µg de extrato total de proteínas oriundo de cultivo em MCc); 1- extrato de proteína de parede celular (225 µg oriundos de preparação usando protocolo de agitação com tampão Tris/Triton por 5 minutos).

5.7 Atividade da proteína GAPDH de extratos de superfície de conídios de *M. anisopliae*

Uma das alternativas às tentativas infrutíferas de localizar a proteína GAPDH na superfície de conídios por *western blot* foi a detecção da atividade da proteína em extratos protéicos obtidos de lavagens de conídios com triton X-100 e medida quantitativa da fluorescência detectada por reação de um anti-soro secundário conjugado à FITC reconhecendo um anti-soro primário contra GAPDH. A presença de GAPDH na superfície celular foi também analisada pela medida da atividade catalítica de GAPDH em extratos protéicos de conídios intactos obtidos por lavagem com triton X-100. Um aumento na atividade de GAPDH foi detectado em um ensaio de 20 minutos, indicando indiretamente a presença da proteína na superfície celular (FIGURA 15A). Com o intuito de quantificar a proteína GAPDH na superfície celular de conídios, a fluorescência das proteínas GAPDH de superfície foi avaliada após imunomarcação com FITC. Sinais de fluorescência, correspondendo a 2,4 vezes mais proteína, foram detectadas em células propositalmente lisadas em comparação a células intactas, indicando uma concentração no interior da célula notavelmente maior da proteína GAPDH, como já era esperado devido aos dados da imunomicroscopia (FIGURA 15B) (os experimentos foram feitos simultaneamente).

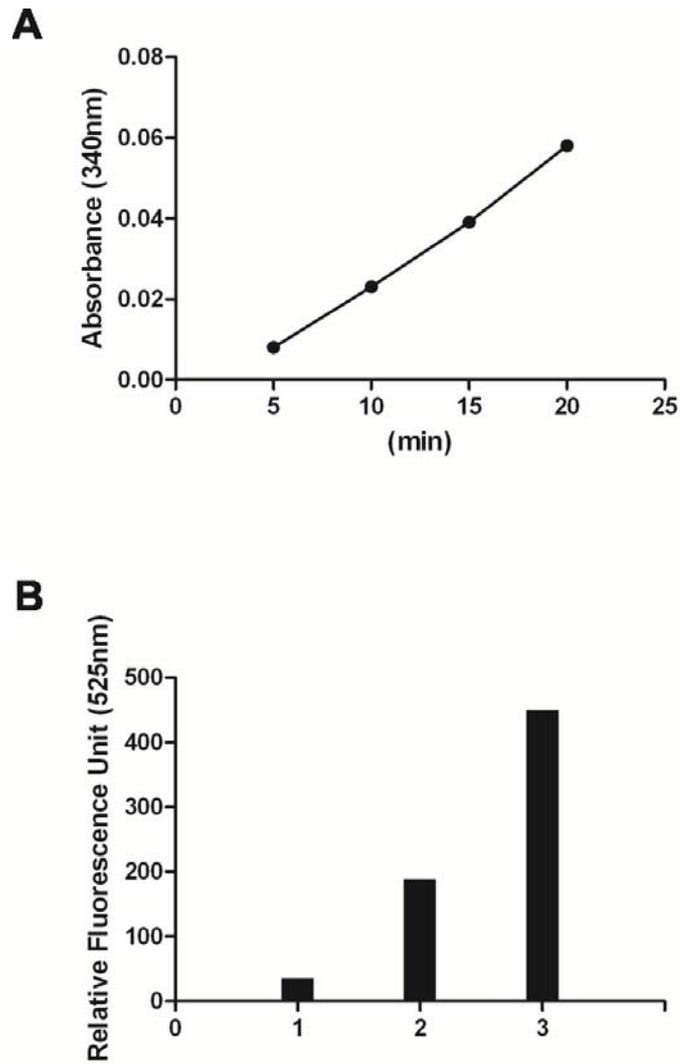


FIGURA 15. Detecção da proteína GAPDH em conídios. (A) Atividade de GAPDH detectada em extratos protéicos de superfície de conídios por 20 minutos a 25 °C. (B) Fluorescência relativa de conídios imuno marcados com anti-soro primário anti GAPDH e posteriormente detectados com anti-soro secundário conjugado à FITC. 1- Controle de conídios sem marcação; 2- conídios detectados com FitC e 3- conídios lisados propositalmente e detecção da proteína com FITC.

5.8 Localização da proteína GAPDH na superfície celular

Com o intuito de definir a localização celular de GAPDH em *M. anisopliae*, conídios, conídios germinados, apressório, micélio e blastosporos foram examinados por microscopia de imunofluorescência e por microscopia confocal. A proteína GAPDH foi detectada tanto na superfície celular como no citosol (FIGURA 16 a FIGURA 29). A acumulação nos pólos germinativos dos conídios germinados, assim como dos blastosporos germinados foi evidenciada com 64 h de incubação em cultivo com meio Adamek. Além disso, quase toda proteína encontrada na célula migrou para os pólos dos blastosporos germinados após 3 h em meio MC (adicionalmente a 64 h de cultivo em meio Adamek), e que foram chamados de blastosporos tardiamente germinados (FIGURA 18 e FIGURA 29). Formas fluorescentes vesiculares puderam ser observadas no citosol e na superfície celular. É interessante perceber também o intenso remodelamento experimentado pelos blastosporos, sob a marcação com *calcofluor white* (FIGURAS 27 e 28).

A comparação dos resultados encontrados na microscopia de fluorescência com os resultados da microscopia confocal reforçaram as convicções a respeito da localização da proteína GAPDH de *M. anisopliae*.

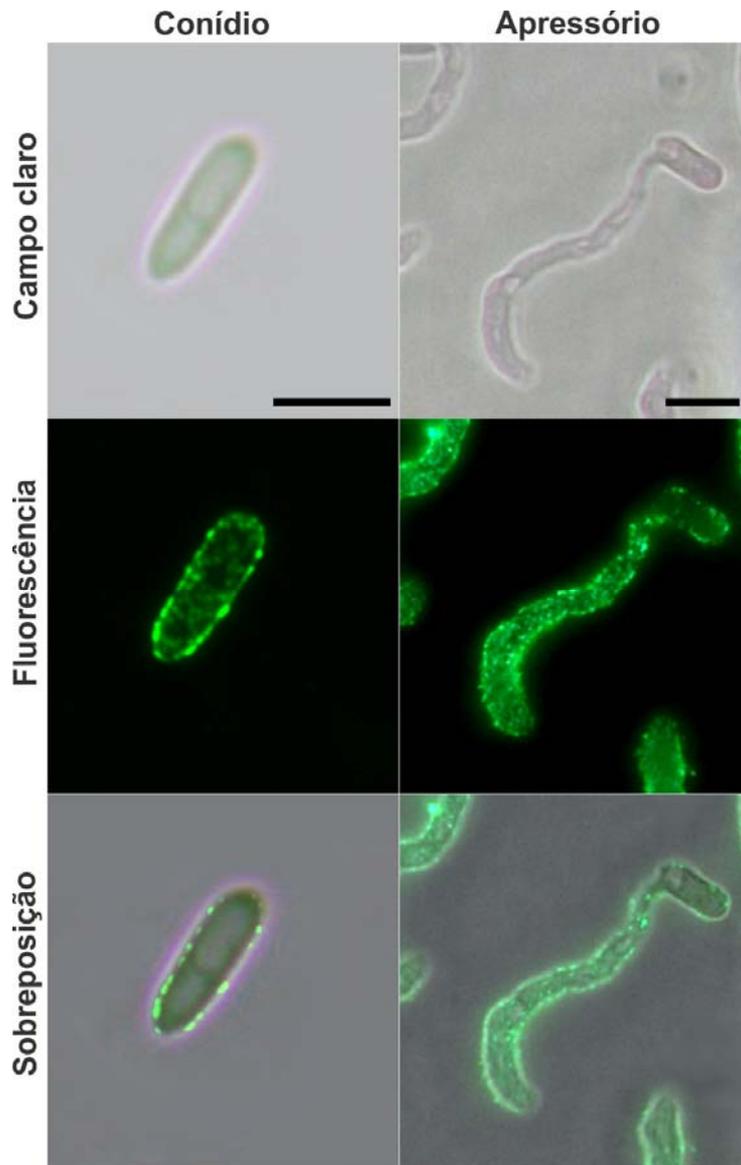


FIGURA 16. Localização da proteína GAPDH em conídios e apressórios de *M. anisopliae*. Foi utilizado anti-soro anti-GAPDH (1:2000) e revelação com anticorpo conjugado a FITC. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência com excitação de 495 nm e emissão de 525 nm. A barra indica 5 μ m.

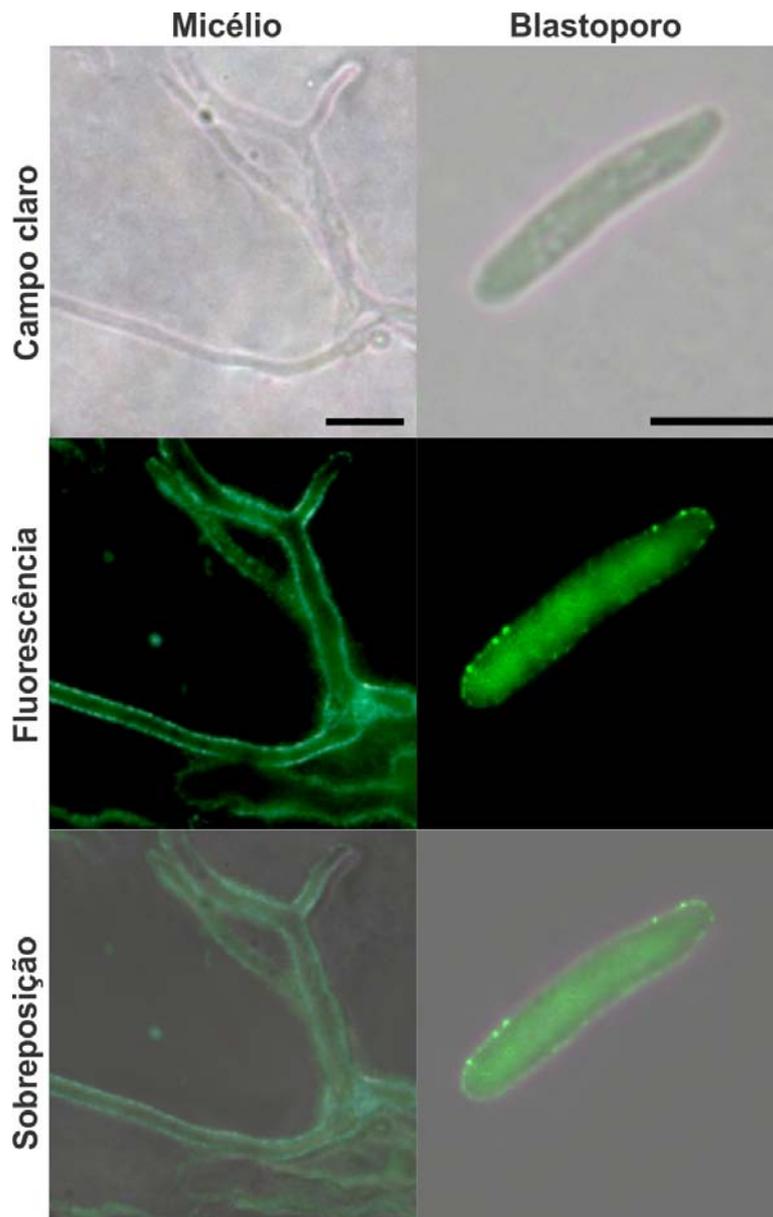


FIGURA 17 Localização da proteína GAPDH em micélio e blastosporos de *M. anisopliae*. Foi utilizado anti-soro anti-GAPDH (1:2000) e revelação com anticorpo conjugado a FITC. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência com excitação de 495 nm e emissão de 525 nm. A barra indica 5 μ m.

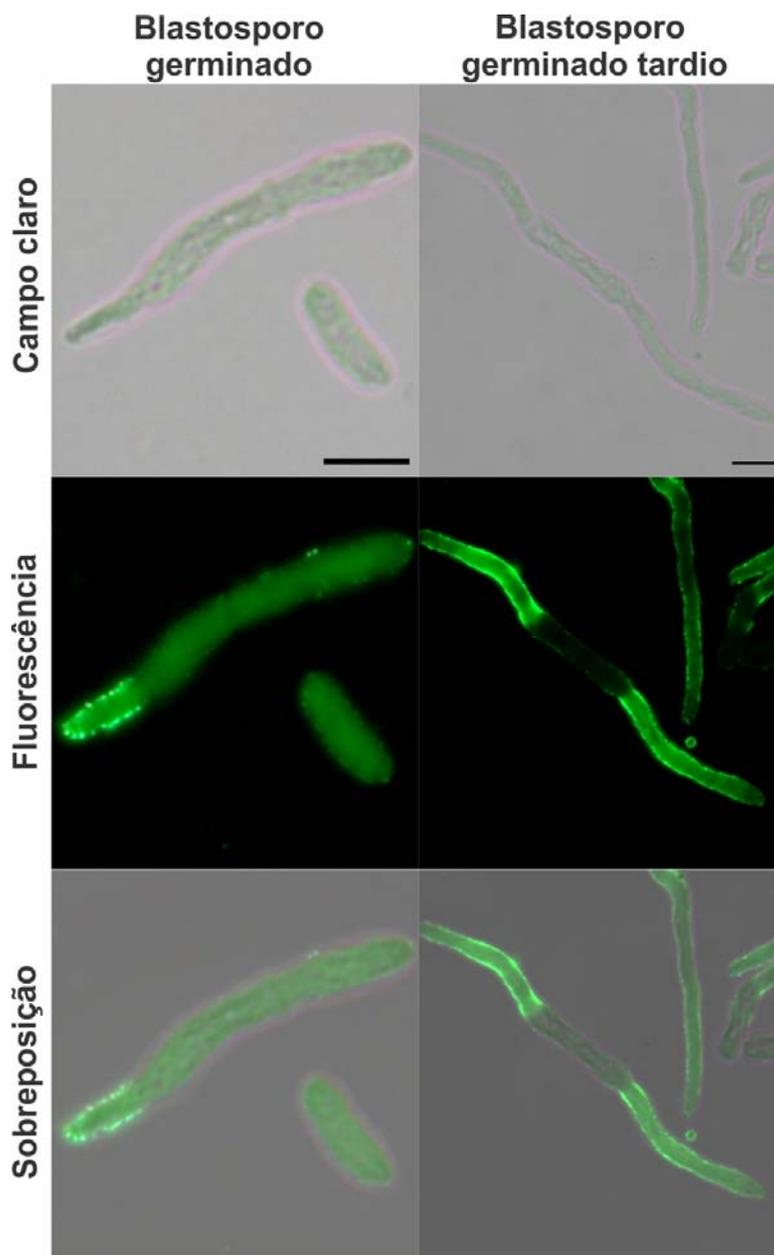


FIGURA 18. Localização da proteína GAPDH em blastosporos germinados e em blastosporos germinados tardios de *M. anisopliae*. Foi utilizado anti-soro anti-GAPDH (1:2000) e revelação com anticorpo conjugado a FITC. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência com excitação de 495 nm e emissão de 525 nm. A barra indica 5 μ m.

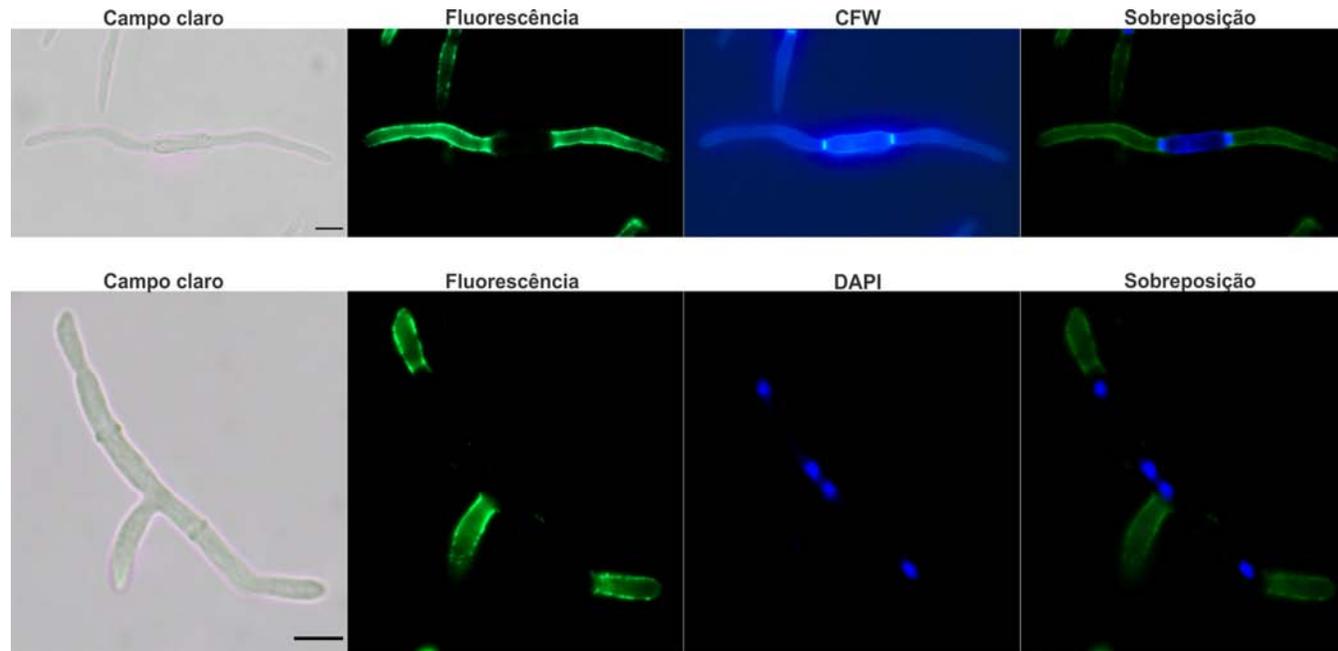


FIGURA 19. Localização da proteína GAPDH em blastosporos germinados tardios de *M. anisopliae*. Foi utilizado anti-soro anti-GAPDH (1:2000) e revelação com anticorpo conjugado a FITC (microscópio de fluorescência com excitação de 495 nm e emissão de 525 nm, em verde). Foram utilizados também detecção com DAPI (excitação de 340 nm e emissão de 488 nm, em azul) e calcofluor *white* (excitação de 355 nm e emissão de 433 nm, em azul). A barra indica 5 µm.

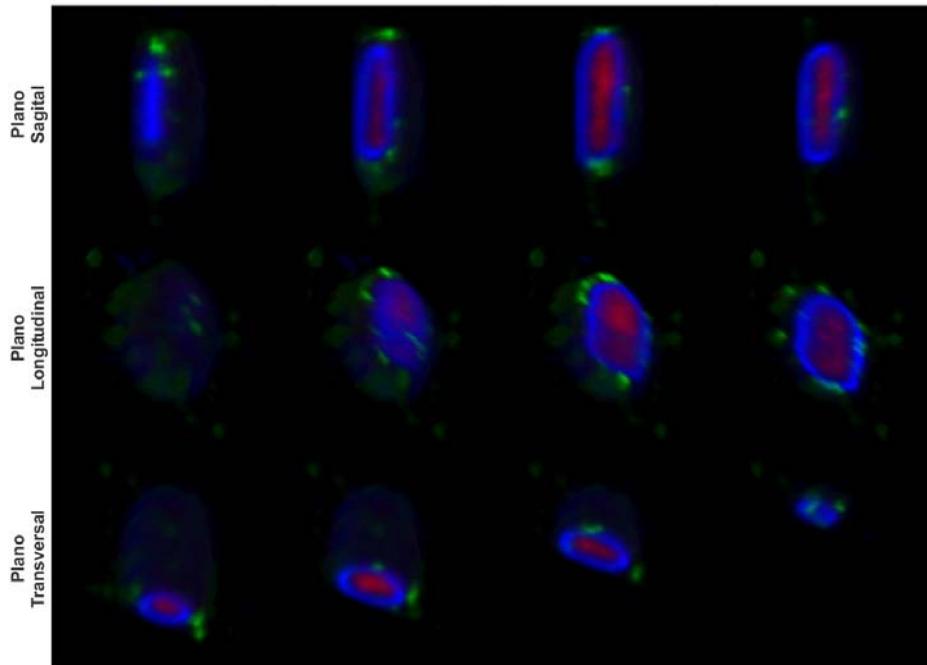


Figura 20. Localização da proteína GAPDH em conídios de *M. anisopliae* utilizando microscopia confocal. Foi utilizado anti-soro anti-GAPDH (1:2000) e revelação com anticorpo conjugado a FITC (microscópio de fluorescência com excitação de 495 nm e emissão de 525 nm, em verde). Foram utilizados também detecção com calcofluor *white* (excitação de 355 nm e emissão de 433 nm, em azul) e FM4-64 (excitação de 550 nm e emissão de 700 nm, em vermelho). A legenda a esquerda das figuras indica o plano dos cortes observados. Cada coluna representa uma profundidade diferente de corte.

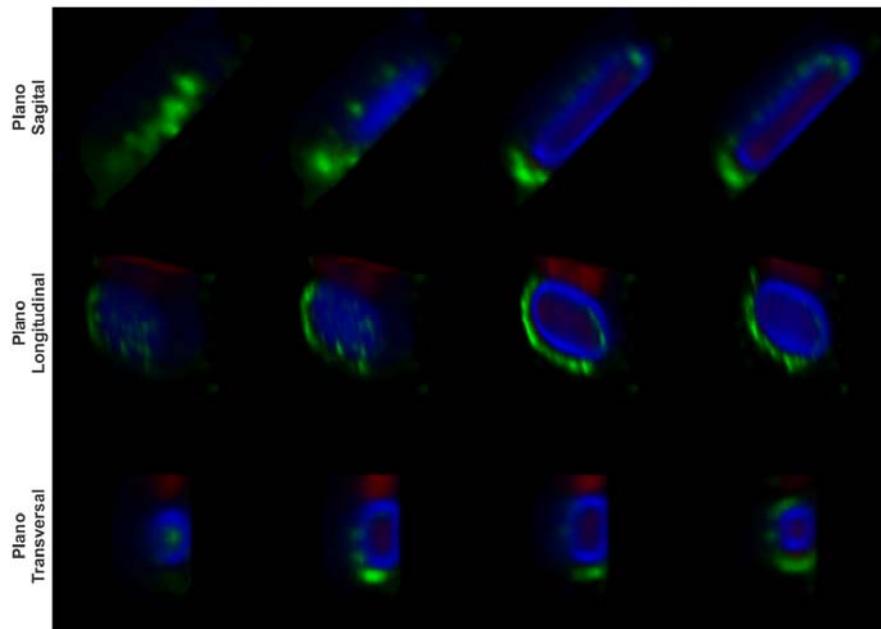


Figura 21. Localização da proteína GAPDH por imunofluorescência confocal em conídios de *M. anisopliae* Foi utilizado anti-soro anti-GAPDH (1:2000) e revelação com anticorpo conjugado a FITC (microscópio de fluorescência com excitação de 495 nm e emissão de 525 nm, em verde). Foram utilizados também detecção com calcofluor *white* (excitação de 355 nm e emissão de 433 nm, em azul) e FM4-64 (excitação de 550 nm e emissão de 700 nm, em vermelho). A legenda a esquerda das figuras indica o plano dos cortes observados. Cada coluna representa uma profundidade diferente de corte.

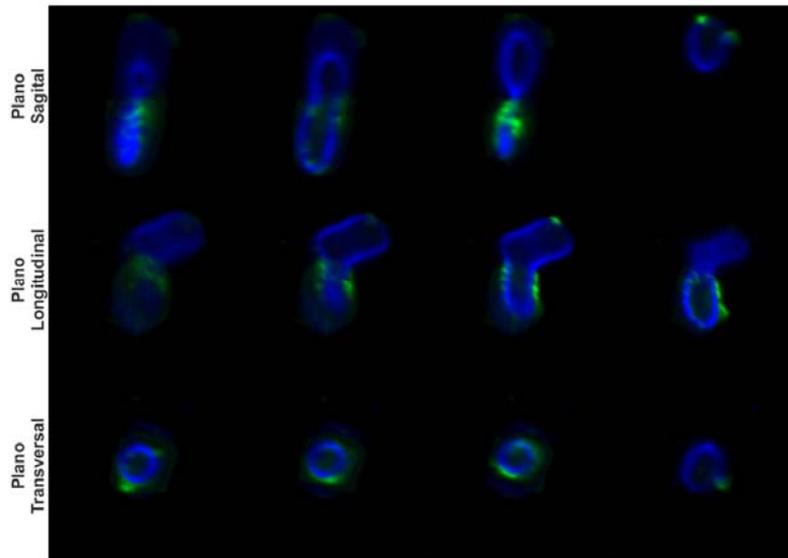


Figura 22. Localização da proteína GAPDH por imunofluorescência confocal em conídios germinados de *M. anisopliae*. Foi utilizado anti-soro anti-GAPDH (1:2000) e revelação com anticorpo conjugado a FITC (microscópio de fluorescência com excitação de 495 nm e emissão de 525 nm, em verde). Foi utilizado também detecção com calcofluor *white* (excitação de 355 nm e emissão de 433 nm, em azul). A legenda à esquerda das figuras indica o plano dos cortes observados. Cada coluna representa uma profundidade diferente de corte.

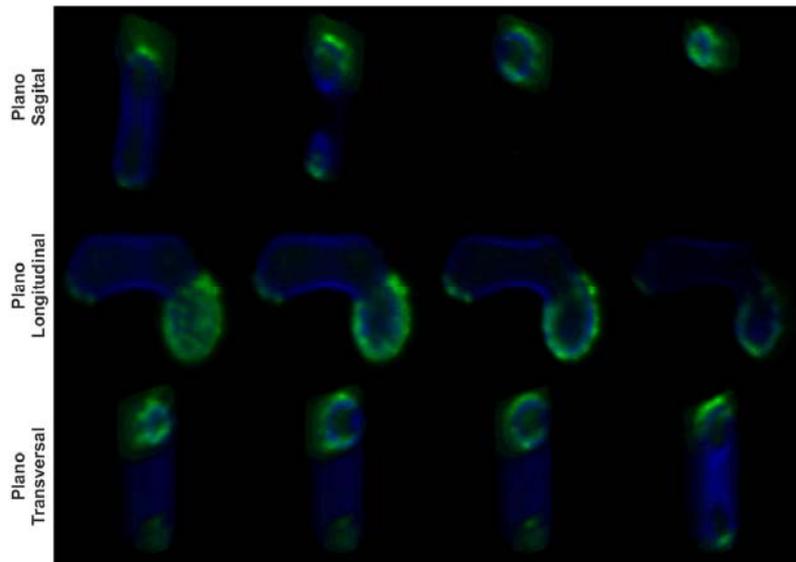


Figura 23. Localização da proteína GAPDH por imunofluorescência confocal em conídios germinados de *M. anisopliae* Foi utilizado anti-soro anti-GAPDH (1:2000) e revelação com anticorpo conjugado a FITC (microscópio de fluorescência com excitação de 495 nm e emissão de 525 nm, em verde). Foi utilizado também detecção com calcofluor *white* (excitação de 355 nm e emissão de 433 nm, em azul). A legenda à esquerda das figuras indica o plano dos cortes observados. Cada coluna representa uma profundidade diferente de corte.

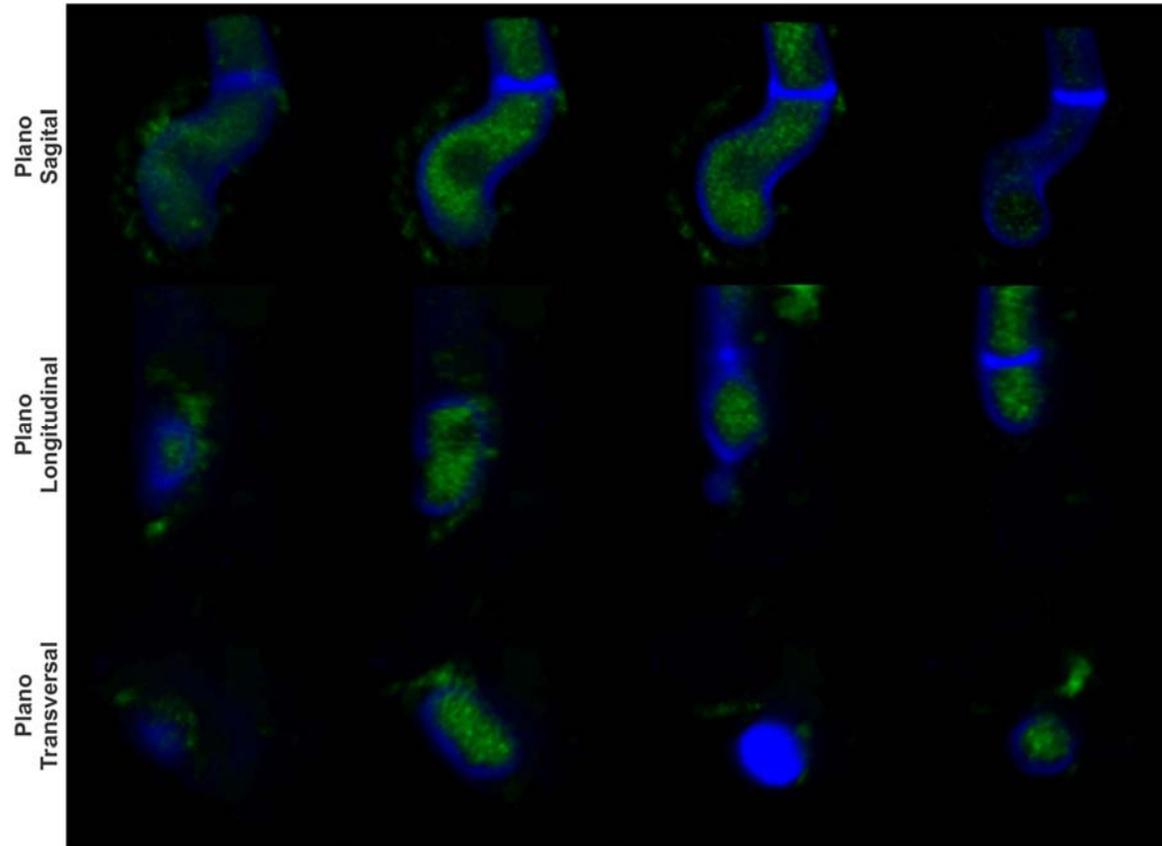


Figura 24 Localização da proteína GAPDH por imunofluorescência confocal em apressórios de *M. anisopliae*. Foi utilizado anti-soro anti-GAPDH (1:2000) e revelação com anticorpo conjugado a FITC (microscópio de fluorescência com excitação de 495 nm e emissão de 525 nm, em verde). Foi utilizado também detecção com calcofluor *white* (excitação de 355 nm e emissão de 433 nm, em azul). A legenda à esquerda das figuras indica o plano dos cortes observados. Cada coluna representa uma profundidade diferente de corte.

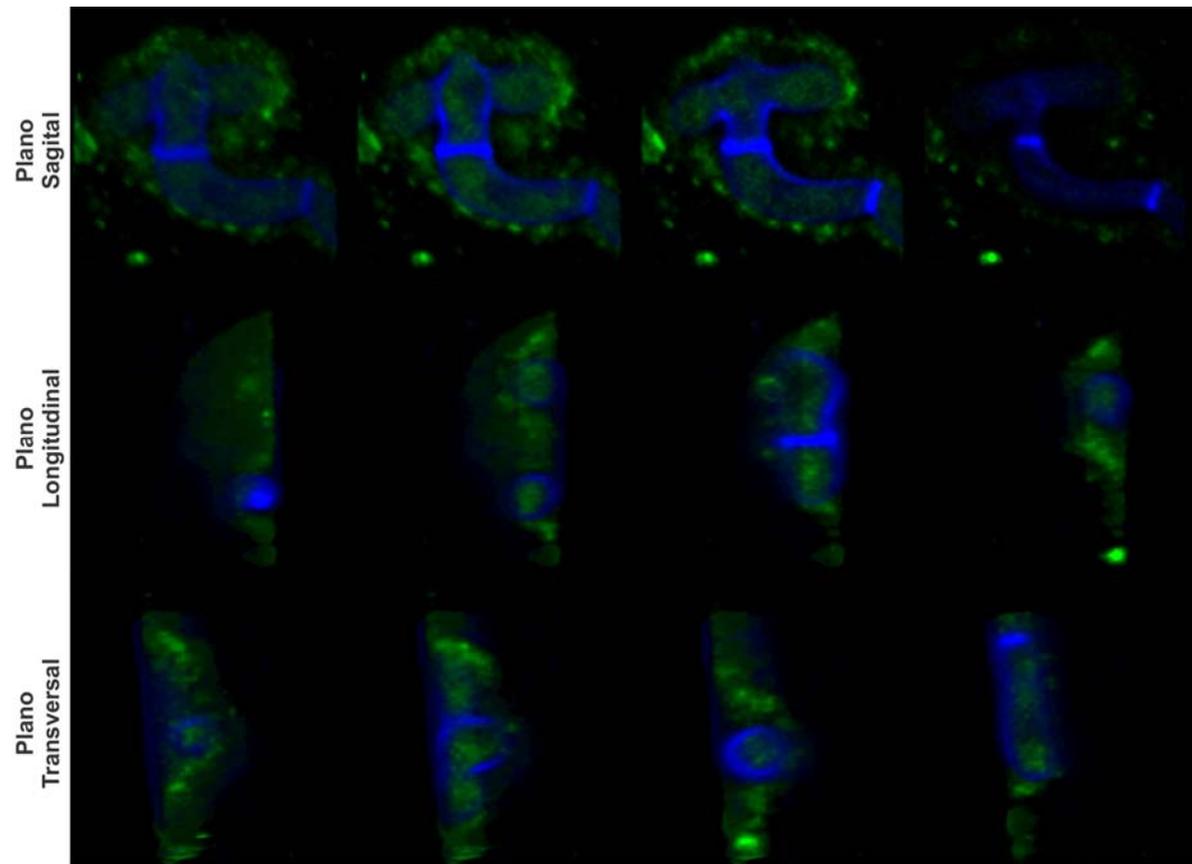


Figura 25. Localização da proteína GAPDH por imunofluorescência confocal em apressórios de *M. anisopliae*. Foi utilizado anti-soro anti-GAPDH (1:2000) e revelação com anticorpo conjugado a FITC (microscópio de fluorescência com excitação de 495 nm e emissão de 525 nm, em verde). Foi utilizado também detecção com calcofluor *white* (excitação de 355 nm e emissão de 433 nm, em azul). A legenda à esquerda das figuras indica o plano dos cortes observados. Cada coluna representa uma profundidade diferente de corte.

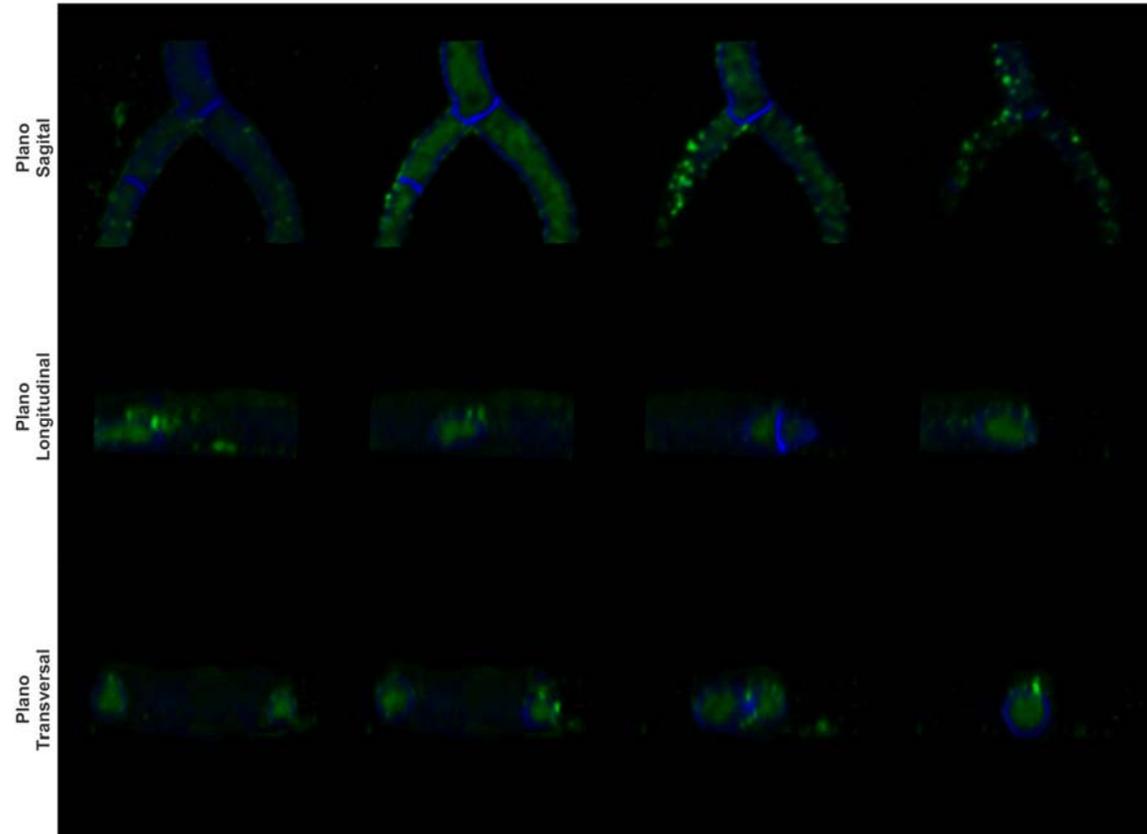


Figura 26. Localização da proteína GAPDH por imunofluorescência confocal em micélio de *M. anisopliae* Foi utilizado anti-soro anti-GAPDH (1:2000) e revelação com anticorpo conjugado a FITC (microscópio de fluorescência com excitação de 495 nm e emissão de 525 nm, em verde). Foi utilizado também detecção com calcofluor *white* (excitação de 355 nm e emissão de 433 nm, em azul). A legenda à esquerda das figuras indica o plano dos cortes observados. Cada coluna representa uma profundidade diferente de corte.

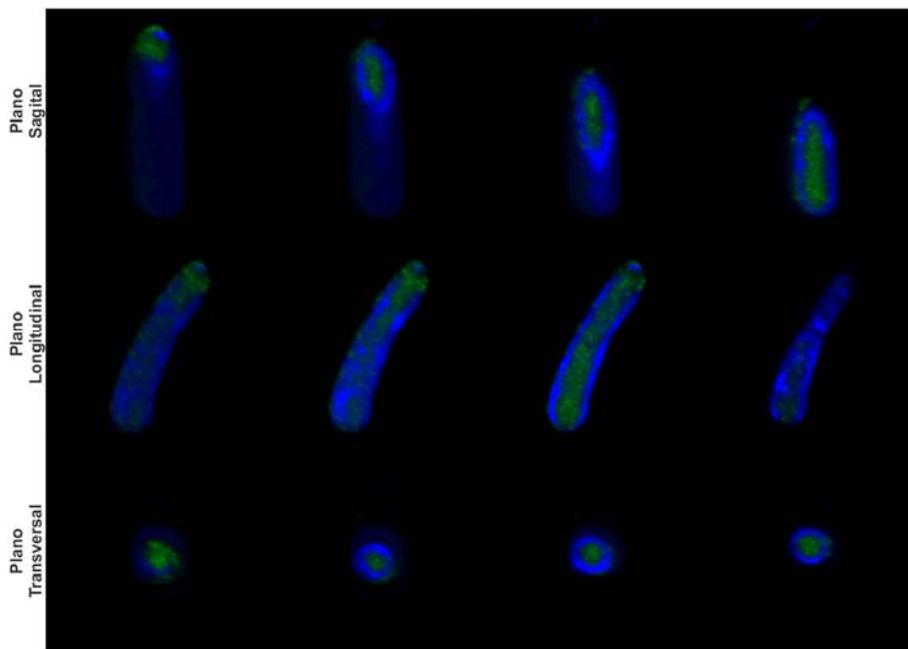


Figura 27. Localização da proteína GAPDH por imunofluorescência confocal em blastosporos de *M. anisopliae*. Foi utilizado anti-soro anti-GAPDH (1:2000) e revelação com anticorpo conjugado a FITC (microscópio de fluorescência com excitação de 495 nm e emissão de 525 nm, em verde). Foi utilizado também detecção com calcofluor *white* (excitação de 355 nm e emissão de 433 nm, em azul). A legenda à esquerda das figuras indica o plano dos cortes observados. Cada coluna representa uma profundidade diferente de corte.

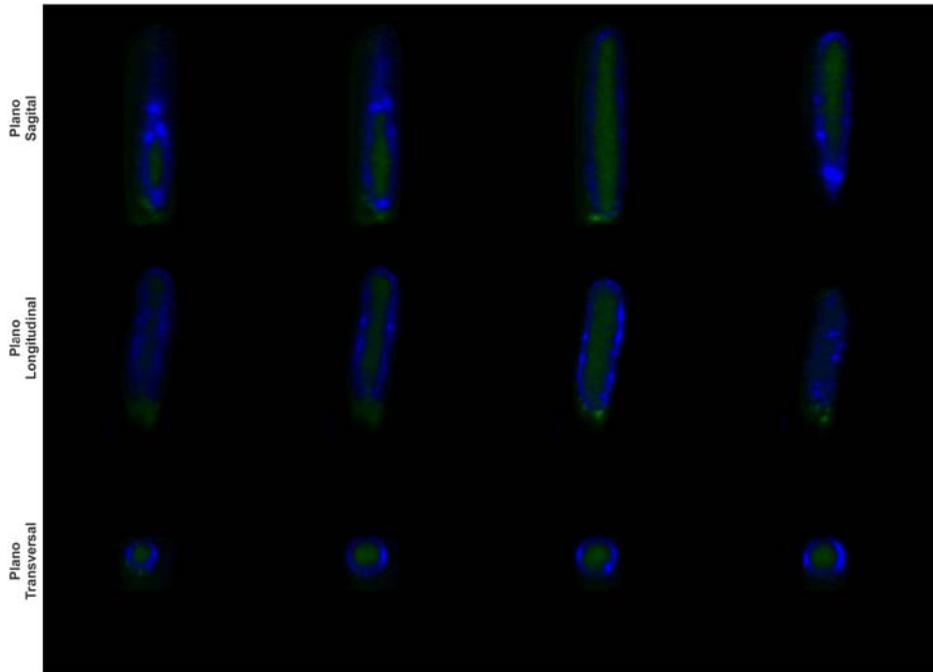


Figura 28. Localização da proteína GAPDH por imunofluorescência confocal em blastosporos de *M. Anisopliae*. Foi utilizado anti-soro anti-GAPDH (1:2000) e revelação com anticorpo conjugado a FITC (microscópio de fluorescência com excitação de 495 nm e emissão de 525 nm, em verde). Foi utilizado também detecção com calcofluor *white* (excitação de 355 nm e emissão de 433 nm, em azul). A legenda à esquerda das figuras indica o plano dos cortes observados. Cada coluna representa uma profundidade diferente de corte.

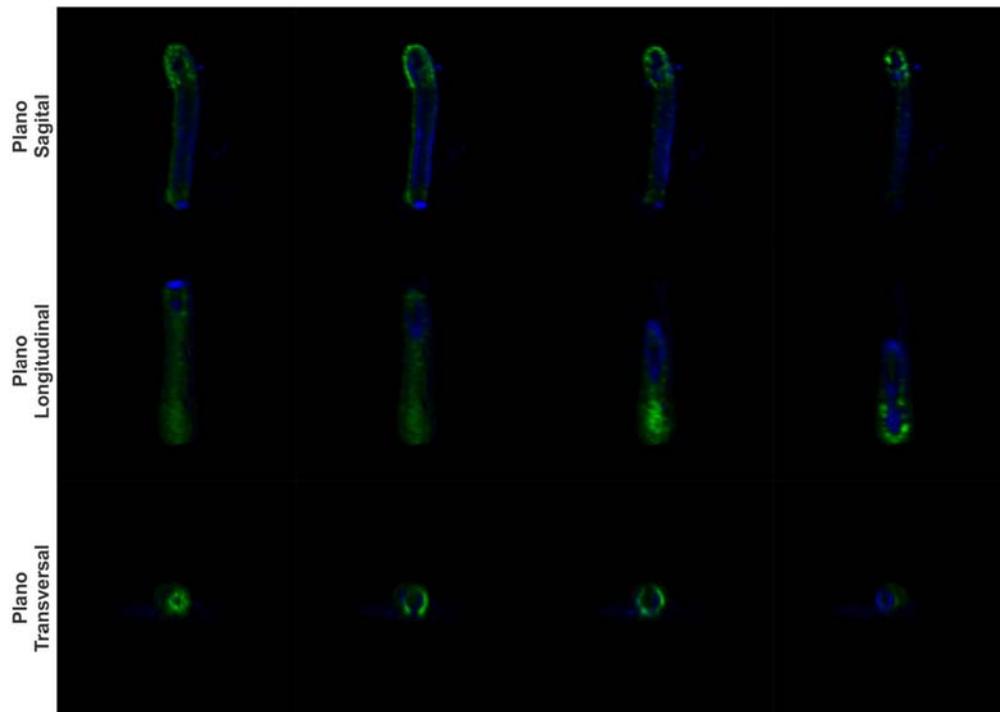


Figura 29. Localização da proteína GAPDH por imunofluorescência confocal em blastosporos germinados de *M. anisopliae*. Foi utilizado anti-soro anti-GAPDH (1:2000) e revelação com anticorpo conjugado a FITC (microscópio de fluorescência com excitação de 495 nm e emissão de 525 nm, em verde). Foi utilizado também detecção com calcofluor *white* (excitação de 355 nm e emissão de 433 nm, em azul). A legenda à esquerda das figuras indica o plano dos cortes observados. Cada coluna representa uma profundidade diferente de corte.

5.9 Inibição da adesão de conídios de *M. anisopliae* em asas de inseto pela ação da proteína GAPDH recombinante e pelo anti-soro anti-GAPDH

Ensaio de adesão de conídios de *M. anisopliae* em asas de *D. peruvianus*, mostraram que 71 % ($2279 \pm 246,0$) dos conídios selvagens aderidos às asas do inseto não puderam ser removidos por lavagem com 0,05 % de tween 20. Quando os conídios foram tratados com anti-soro anti-GAPDH, anteriormente à exposição às asas, apenas 1,3 % ($30,07 \pm 4,959$) ($P < 0,0001$) dos conídios se aderiram, mostrando que os anti-soros bloqueiam a ligação dos conídios às asas de maneira eficiente. A fim de excluir um possível efeito inespecífico do anti-soro, como, por exemplo, impedimento espacial, nós utilizamos o anti-soro anti-CHI2 como controle. O anti-soro anti-CHI2 reage com uma quitinase de *M. anisopliae* na superfície dos conídios que não possui envolvimento no processo de adesão (Boldo *et al.*, 2009) e não afetou a adesão ($1972 \pm 166,7$ antes da lavagem e 1712 ± 177 após a lavagem). Quando as asas foram tratadas com a proteína GAPDH recombinante a adesão diminuiu para 31 % ($697,7 \pm 132,4$) e 11% ($254,3 \pm 41,37$) ($P < 0,0001$) antes e depois da lavagem, respectivamente. Novamente, para excluir um possível bloqueio inespecífico da adesão pelo tratamento com a proteína recombinante, nós utilizamos um controle de asas tratadas com BSA. Neste caso, a adesão foi de $2205 \pm 207,8$ e $1974 \pm 120,4$ antes e após a lavagem, respectivamente (FIGURA 30). A FIGURA 31 mostra a microscopia de fluorescência de alguns analisados de asas expostas aos conídios nas diferentes condições do experimento.

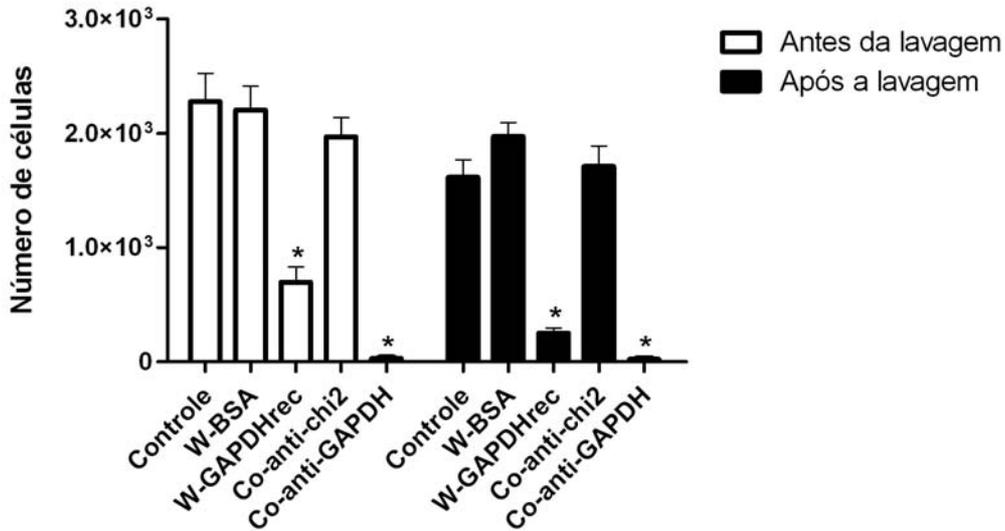


Figura 30. Ensaio de adesão de conídios de *M. anisopliae* em asas de *Dysdercus peruvianus* mostrando a participação da proteína GAPDH. O histograma quantifica o número de conídios aderidos a asas de *D. peruvianus*. Como controle positivo do experimento, conídios selvagens e asas de insetos não sofreram nenhum tipo de incubação. W-BSA: asas incubadas com BSA. W-GAPDHrec: asas incubadas com proteína recombinante GAPDH. Co-anti-chi2: conídio incubado com anti-chi2. Co-anti-GAPDH: conídio incubado com anti-GAPDH. Os valores representam as médias \pm o erro padrão. Barras vazias, antes da lavagem; barra preta, após a lavagem. Os asteriscos indicam valores estatisticamente diferentes do controle (valor de $P < 0,0001$).

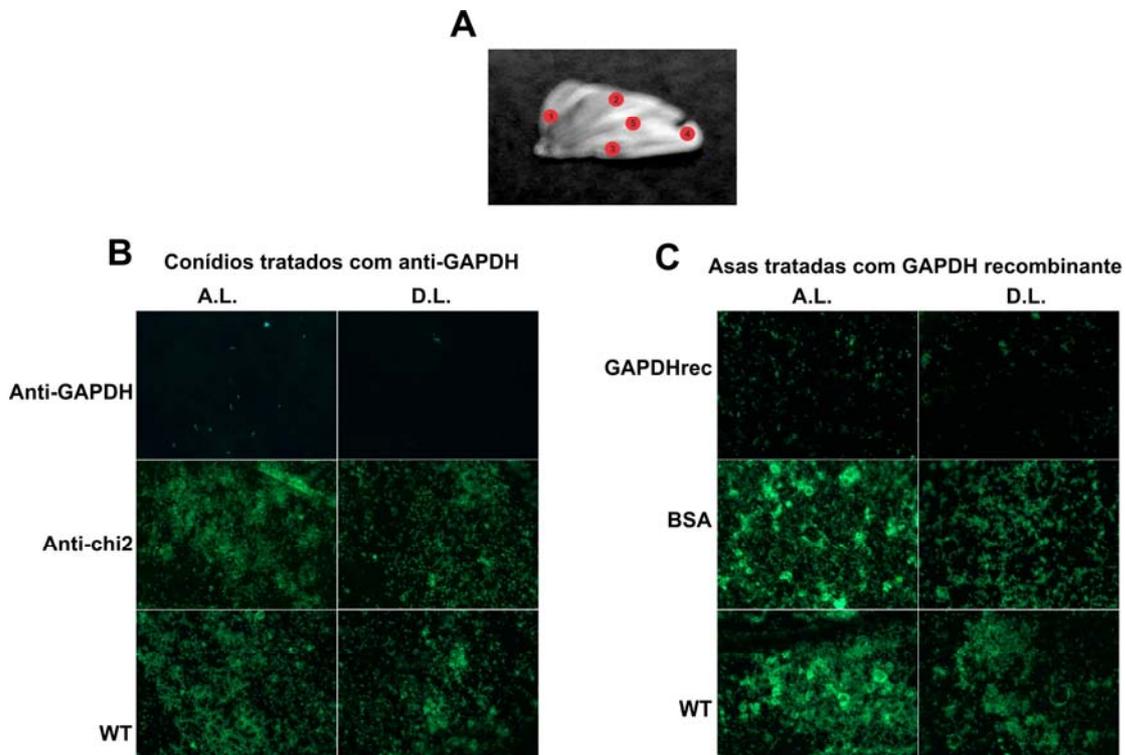


Figura 31. Ensaio de adesão de conídios de *M. anisopliae* contra asas de *D. peruvianus*. (A) Esquema da asa de *D. peruvianus* ressaltando os campos observados sob microscópio. (B) Microscopia de fluorescência (linhagem de *M. anisopliae* expressando GFP) de conídios tratados com anti-GAPDH. A.L. (antes da lavagem) e D.L. (após a lavagem).

6. DISCUSSÃO

Um dos principais focos de investigação científica em Biologia atualmente é a atribuição da função gênica e sua regulação. Os projetos em larga escala de seqüenciamento de genomas, transcriptomas e proteomas têm gerado uma quantidade enorme de informações, muito da qual é redundantes. Assim, alguns genes já foram caracterizados em diversos organismos, enquanto outros continuam com a sua função indeterminada. Estes projetos também têm mostrado que existe uma grande diversidade na natureza o que torna ainda mais difícil determinar a função de um gene por simples comparação. Contrariamente a essa diversidade e complexidade, algumas proteínas desempenham mais de uma função na mesma célula, e são denominadas proteínas multifuncionais ou proteínas *moonlighting* (Jeffery *et al.*, 2005, 2009). Esse é o caso de algumas proteínas muito “comuns” e envolvidas em rotas metabólicas básicas na fisiologia celular. Descobrir as outras funções destas proteínas tem sido um desafio, mas em muitos sistemas descobertas muito relevantes foram realizadas.

Em particular a proteína GAPDH, uma enzima básica da via glicolítica em todos os organismos onde foi estudada, apresenta uma diversidade de funções adicionais que são fundamentais para a biologia da célula (Sirover, 2005). Vários estudos revelaram que GAPDH possui localização no núcleo e na superfície da célula, além da localização citosólica já bem conhecida. Nestas localizações alternativas, a proteína desempenha funções não usuais como na endocitose e na fusão de membranas, no transporte vesicular secretório, no controle da tradução; no transporte de tRNA nuclear, na

replicação de DNA e no reparo de DNA. GAPDH ainda está envolvida com a morte celular independente de caspase (Colell, *et al.*, 2007). Outros tipos de funções alternativas descritas para a proteína são aquelas envolvidas com o processo de infecção dos patógenos em seus hospedeiros; alguns exemplos são o envolvimento com a adesão e com a evasão do sistema imune do hospedeiro (Crowe, *et al.*, 2003, Barbosa, *et al.*, 2006, Terao, *et al.*, 2006, Egea, *et al.*, 2007, Hoelzle, *et al.*, 2007, Zhang, *et al.*, 2007, Kinoshita, *et al.*, 2008, Zhang, *et al.*, 2008, Lama, *et al.*, 2009, Lu, *et al.*, 2009).

Quando a sequência parcial do gene *gpdh1* foi isolada pela primeira vez, a partir de células de *Metarhizium anisopliae* cultivado em condições que mimetizam o processo de infecção, ela foi considerada casual. Entretanto, a partir de dados da literatura e de experimentos de Northern *blot* em nosso laboratório, foi evidenciado que este gene, diferentemente do padrão constitutivo considerado absoluto em alguns fungos (Alves, *et al.*, 2004, Kuo, *et al.*, 2004, Pachlinger, *et al.*, 2005), tinha a sua transcrição regulada pelo substrato adicionado ao meio de cultura, de forma semelhante a padrões também já observados (Wolff & Arnau, 2002, Larsen, *et al.*, 2004). Este resultado nos levou a propor o desenvolvimento deste trabalho que visou identificar outras possíveis atividades de GAPDH em *Metarhizium*.

Iniciamos este trabalho pela clonagem, caracterização do gene *gpdh1* e pela determinação de que o gene está presente em uma única cópia no genoma de *M. anisopliae*. A sequência deduzida de resíduos de aminoácidos do cDNA e do DNA genômico do gene *gpdh1* foram confirmadas por identificação da proteína de *M. anisopliae* utilizando MS. A banda nativa majoritária de (36 kDa e pI 7,0) foi isolada por eletroforese bidimensional de

extrato protéico micelial de *M. anisopliae*. As outras duas isoformas da proteína, de 36 kDa e pIs de 6,6 e 6,8, observadas em experimentos de imunodeteccção utilizando o anti-soro anti-GAPDH, levando-nos a supor, com base na identidade destas com a forma predominante, que estas representam isoformas de GAPDH, embora quantidades suficientes não foram obtidas para a obtenção cabal das identificações. Um padrão de multiplicidade de isoformas poderia sugerir diferentes funções para cada isoforma, como já encontrado em outros sistemas (Barbosa, *et al.*, 2004, Benndorf, *et al.*, 2008).

Os primeiros experimentos propostos após o isolamento do gene, e antes mesmo da identificação da proteína por espectrometria de massas, foram realizados para verificar possíveis alterações no padrão transcricional do gene *gpdh1*, pois há relatos na literatura de tal fenômeno em outros organismos e em outros fungos (Wolff *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2003; Hara *et al.*, 2006; Mitsuzawa *et al.*, 2005; Sirover 2005; Egea *et al.*, 2007). O primeiro experimento neste sentido foi realizado para determinar os padrões dos transcritos de *gpdh1* frente a diferentes fontes de carbono, regulação que já havia sido descrita em outros fungos e que poderia sugerir algum mecanismo de regulação do gene.

Em *Mucor circinelloides*, o ortólogo de *gpdh1* também apresentou um padrão de regulação bem definido que é inicialmente regulado em resposta a fontes de carbono por um mecanismo que inclui um regulador negativo (Larsen *et al.*, 2004). O comportamento transcricional de *gpdh1* de *M. anisopliae* em resposta a diferentes fontes de carbono nos levou a inferir que, tanto o glicerol como o etanol, estariam sendo assimilados diretamente pela via do ciclo do ácido cítrico e pela cadeia de fosforilação oxidativa. Devido à ausência de

glicose nestas condições experimentais, os transcritos do gene *gpdh1* estariam fortemente reprimidos. Esta observação apóia o fato de que o metabolismo aeróbio prevalece em *M. anisopliae*, assim como em outros fungos filamentosos tais como *Trichoderma reesei* (Chambergo, *et al.*, 2002). Um mecanismo bem conhecido de modulação gênica envolvido na repressão por catabólito de carbono é descrito em *Aspergillus nidulans* (Mogensen, *et al.*, 2006). (Mogensen, *et al.*, 2006). Quando *A. nidulans* é cultivado em fontes menos favoráveis de carbono (como glicerol ou etanol), o fungo reprime os genes envolvidos na utilização de fontes favoráveis de carbono, como glicose. Uma proteína importante que controla a repressão por catabólito de carbono é a proteína CreA de *A. nidulans* (Mogensen, *et al.*, 2006). Em *M. anisopliae*, a repressão em resposta a diferentes fontes de carbono é modulada pela proteína CRR1 (Screen, *et al.*, 1997), ortólogo de CreA.

Após observar que de fato ocorria regulação dos transcritos do gene *gpdh1* de *M. anisopliae*, a próxima etapa era verificar se a proteína apresentaria regulação hierárquica ou regulação metabólica (ter Kuile & Westerhoff, 2001). A hipótese que rege a maioria dos estudos de análise genômica ou transcricional é a de que a expressão de um gene no nível transcricional prediz, quantitativamente, o quão ativo o gene está naquele momento. Por exemplo, um sinal "n" vezes maior em um resultado de *Northern blot* ou um nível aumentado em um *chip de microarray* significa "n" vezes mais proteína e "n" vezes mais função. No caso de razões enzimáticas que são parte de uma via metabólica, esta suposição pode não refletir a realidade. Em qualquer momento a taxa de uma reação enzimática é a função do seu substrato(s), produto(s), modificador(es), conhecidos como propriedades

metabólicas e de sua expressão gênica, modificando a concentração da enzima em questão (ter Kuile & Westerhoff, 2001). Como definido por Kuile e Westerhoff, as modificações metabólicas são todas aquelas que são causadas pelas concentrações do substrato(s), produto(s) e modificador(es). Já as modificações hierárquicas são todas aquelas causadas pelas alterações nas concentrações das enzimas por alterações no sequestro de mRNA ou por diferentes localizações intracelulares destes, ou ainda a taxa na qual estes mRNAs são assimilados, seja por transcrição, tradução ou degradação. A análise por *Western blot* da proteína GAPDH sob as mesmas condições metabólicas, mostrou o mesmo padrão de regulação traducional em resposta às diferentes fontes de carbono: glicose, glicerol ou etanol, que o padrão de regulação transcricional. Com isso, pudemos constatar que, sob estas condições de regulação, a tradução da proteína GAPDH obedece a um padrão de regulação hierárquica bem definido. Contudo, existe a possibilidade da proteína estar sob o controle de ambos os tipos de regulação.

Uma diminuição importante no acúmulo de transcritos de *gpdh1* em amostras de RNA extraídas de *M. anisopliae* cultivado em meio contendo quitina também foi observada em análise por *Northern blot* comparada aos transcritos obtidos em meio contendo exoesqueleto ou glicose como única fonte de carbono. A ausência de fontes de carbono metabolicamente favoráveis no meio contendo quitina teria desencadeado um mecanismo de regulação negativa do gene *gpdh1*, simultaneamente à regulação positiva de genes codificando enzimas necessárias para a utilização de fontes de carbono menos favoráveis para o fungo. A complexidade da composição do exoesqueleto adicionado ao meio de cultivo é difícil de ser determinada. Isto poderia explicar

a regulação positiva de *gpdh1* em meio contendo exoesqueleto, em adição a um provável papel da proteína GAPDH na adesão ao hospedeiro, pois outras fontes favoráveis de carbono poderiam estar presentes no meio contendo exoesqueleto como substrato (Mogensen *et al.*, 2006; Dutra *et al.*, 2004). Entretanto, nada impede que essa regulação positiva esteja relacionada a um possível papel alternativo envolvendo a proteína GAPDH e a superfície do hospedeiro. Estes resultados permitem supor o envolvimento de GAPDH em algum outro processo essencial para a célula do fungo.

São muitos os relatos na literatura descrevendo a localização celular da proteína GAPDH na superfície dos microrganismos (Alvarez, *et al.*, 2003, Bergmann, *et al.*, 2004, Barbosa, *et al.*, 2006, Kinoshita, *et al.*, 2008, Lama, *et al.*, 2009). Logo, a localização celular da proteína era uma das próximas questões a serem abordadas. A primeira tentativa que fizemos neste sentido foi a de localizar a proteína em extratos protéicos da superfície de conídios. Um teste inicial foi feito pela agitação de uma suspensão de conídios em PBS 1X, que acabou gerando um extrato muito pouco concentrado, o que inviabilizava qualquer tentativa de detecção por *Western blot*. Em uma segunda tentativa, um protocolo bem estabelecido para a extração de proteínas de superfície de conídios (Silva *et al.*, 2009) foi utilizado, e o sucesso da extração foi alcançado, obtendo-se grandes quantidades de proteína nas frações extraídas. Contudo, a detecção por *Western blot* se mostrou pouco conclusiva, mesmo após diversas repetições.

Uma alternativa para localizar a proteína GAPDH na fração protéica da superfície de conídios foi o uso da mesma fração de proteínas (extraídas utilizando agitação com triton X-100) em reações de atividade específica de

GAPDH (redução de NAD^+ à NADH , reação esta que é exclusivamente realizada pela enzima GAPDH quando catalisa a fosforilação oxidativa do substrato gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato). De fato, o aumento da atividade foi observado em um ensaio de 20 minutos, demonstrando, indiretamente a presença da enzima no extrato protéico oriundo da superfície de conídios de *M. anisopliae*. Outra alternativa que se mostrou viável foi a determinação quantitativa da proteína por medida da fluorescência de GAPDH localizada na superfície de conídios utilizando anti-soros secundários conjugados à FITC, os quais reconheceriam o anti-soro primário anti-GAPDH que estaria ligado às respectivas proteínas de superfície. Ambas as abordagens foram bem sucedidas, e demonstraram, ainda que de maneira indireta, a presença da enzima na superfície dos conídios. Esta localização de uma enzima citosólica tem sido cada vez mais relatada em células de eucariotos e procariotos (Barbosa, *et al.*, 2006, Egea, *et al.*, 2007).

Uma das características de *M. anisopliae* é a formação de diferentes tipos celulares ao longo de seu ciclo de vida. Utilizamos essa diversidade celular para verificar a localização da GAPDH. Experimentos de imunomicroscopia de fluorescência e microscopia confocal foram realizados em conídios, conídios germinados, apressórios, micélio, blastosporos e blastosporos germinados. Nestes experimentos foram determinadas duas localizações, GAPDH citosólicas e superfície celular, em estruturas vesiculares, como descrito por Rodrigues *et al.*, (2007, 2008) e por De Jesus *et al.*, (2009). A presença de GAPDH na superfície de células de *M. anisopliae* levanta algumas questões, como, por exemplo, como a incorporação da proteína na parede celular ocorre na ausência de um peptídeo sinal responsável pelo

endereçamento da proteína na via secretória. As estruturas vesiculares observadas poderiam nos levar a sugerir uma hipótese de exportação da proteína por uma via de secreção de vesículas através da parede celular (Rodrigues, *et al.*, 2007, De Jesus, *et al.*, 2009). Entretanto mais estudos são necessários para verificar esta possibilidade.

Um fato interessante que foi observado tanto em conídios germinados como em blastosporos germinados é a localização da proteína no pólo germinativo da célula. Em ambos os tipos celulares a migração é tão intensa que existem células onde a presença de GAPDH no pólo não germinativo é quase nula. Outra observação interessante é a quase ausência da proteína na superfície de blastosporos. A marcação da proteína com anti-soro conjugado à FITC e contra marcação de quitina com *calcofluor white*, em blastosporos, foi exaustivamente observada utilizando microscopia de fluorescência e a ausência da proteína na superfície parecia não obedecer a nenhum padrão que nós pudéssemos observar. . Em blastosporos, ficou evidente pela marcação com *calcofluor white* que o remodelamento da parede celular gera profundas modificações estruturais. Até mesmo a estrutura externa dos blastosporos apresentava sinais de deformação, semelhantes a saliências, e a parede celular estava visivelmente desestruturada, sofrendo remodelamento.

Objetivando verificar um possível envolvimento da proteína GAPDH no processo de adesão do conídio de *M. anisopliae*, foi utilizado um modelo de adesão em asas de *D. peruvianus* (Wang & St Leger, 2007). Este experimento foi composto de dois objetivos: (i) verificar se o tratamento de conídios de *M. anisopliae* com o anti-soro anti-GAPDH inibia de alguma forma a adesão, por inibição da GAPDH da superfície do conídio. A fim de descartar a possibilidade

da inibição da adesão ser causada por bloqueio espacial gerado pela ligação do anti-soro à superfície do conídio, anti-CHI2 foi utilizado como controle negativo; (ii) verificar se o tratamento das asas do inseto com a proteína GAPDH recombinante inibia a adesão por bloqueio dos possíveis receptores para GAPDH encontrados em sua superfície. Com o intuito de descartar a possibilidade da proteína recombinante GAPDH estar bloqueando todo e qualquer receptor encontrado nas asas, nós utilizamos BSA como controle negativo. Analisando o resultado deste experimento, inicialmente verificou-se a considerável inibição da adesão tanto dos conídios tratados com o anti-soro anti-GAPDH assim como da adesão dos conídios às asas tratadas com a proteína recombinante GAPDH, antes e após a lavagem com tween 20. Uma conclusão que se poderia tirar destes resultados é a da participação da proteína GAPDH no processo de adesão, desempenhando função de adesina. Entretanto, a diminuição drástica da adesão já antes mesmo da lavagem das asas - 1,3 % ($30,07 \pm 4,959$) de conídios aderidos - nos leva a pensar no envolvimento da proteína em algum outro processo com maior importância, algum outro processo essencial para a adesão.

A redundância do mecanismo de adesão de *M. anisopliae* e de outros fungos filamentosos relacionados é um fato descrito na literatura (Gale, *et al.*, 1998, Guo, *et al.*, 2000, Fu, *et al.*, 2002, Holder & Keyhani, 2005, Wang & St Leger, 2007). Obviamente o processo de adesão não depende exclusivamente da função de adesina de GAPDH para ser bem sucedido, existem diversas outras proteínas que tem sobreposição desta função. O transporte por vesículas para o espaço extracelular parece ser um processo celular compatível com uma provável função essencial desenvolvida pela proteína,

que faz com que sua supressão gere diferença tão drástica em relação ao conídio não tratado. Se por exemplo a proteína GAPDH estiver envolvida no transporte de vesículas para o espaço extracelular, e se estas vesículas estiverem transportando as proteínas envolvidas no mecanismo de adesão teríamos, de fato, uma inibição drástica do processo (Bryksin & Laktionov, 2008). Esta linha de raciocínio encontraria apoio no resultado do ensaio de adesão dos conídios tratados com o anti-soro anti-GAPDH, mas o resultado das asas tratadas com a proteína GAPDH recombinante levanta outra questão que é conflitante. Uma provável explicação para o resultado seria a primeira hipótese de função da proteína, exclusivamente de adesina. O resultado de adesão dos conídios às asas tratadas com GAPDH pode ser considerado importante - 31 % ($697,7 \pm 132,4$) e 11% ($254,3 \pm 41,37$) conídios aderidos. Se por exemplo, fossem dez as proteínas envolvidas no mecanismo de adesão, incluindo GAPDH, a partir do momento que se inibiu a ação de uma delas (neste caso pela ligação da proteína recombinante no sítio de ação da proteína na asa) ainda haveriam nove proteínas para promover a adesão, ou seja, teríamos a inibição de um décimo da adesão. Obviamente, não se pode simplificar o problema desta forma, pois algumas proteínas podem ter uma importância maior do que outras, mas é uma possibilidade que poderia explicar os resultados.

Muitas vezes para se entender mecanismos complexos, como o processo de infecção dos fungos, precisa-se primeiramente compreender a biologia e a fisiologia básica do microrganismo. Tenta-se muitas vezes compreender apenas uma parte do todo, quando, na verdade, os elementos são quase todos intrinsecamente conectados. No processo de infecção, por

exemplo, muitas vezes as buscas acabam se voltando para uma proteína única, ou um grupo de proteínas, que são imprescindíveis para o processo; entretanto, a literatura vem mostrando, e até mesmo alguns dos próprios experimentos deste trabalho, que devemos focar em algumas proteínas de função básica, pois, muitas vezes, as funções básicas são os alicerces fundamentais, estes sim imprescindíveis, para processos avançados como a infecção. Ainda que não se consiga entender todas as variantes da natureza de proteínas multifuncionais como a GAPDH, exemplos como este reforçam a importância que as proteínas multifuncionais podem ter, contribuindo para maior complexidade dos processos celulares.

7. CONCLUSÕES

- Das três proteínas do extrato protéico de *M. anisopliae* que reagem com o anti-soro anti GAPDH de *P. brasiliensis*, uma isoforma mais alcalina de GAPDH é a majoritária no fungo filamentoso *M. anisopliae*.

- O gene de *M. anisopliae* *gpdh1* apresenta um padrão de regulação transcricional que responde a diferentes fontes de carbono, ocorrendo diminuição do nível de transcritos do gene quando o fungo foi cultivado em meio contendo fontes menos favoráveis de carbono.

- A análise da expressão da proteína GAPDH sugere um comportamento de regulação hierárquico, pelo menos nas condições fisiológicas analisadas (diferentes fontes de carbono).

- Em *M. anisopliae*, a proteína GAPDH, além de apresentar localização citosólica, localiza-se também na superfície das células do fungo.

- A observação da proteína GAPDH nos diferentes tipos celulares de *M. anisopliae* por microscopia mostrou que, na grande maioria dos casos, ela está presente também na superfície celular.

- Nos blastosporos a proteína GAPDH é observada apenas raramente na superfície da célula e, mesmo assim, com distribuição muito restrita. Nos

blastosporos ocorre intenso remodelamento da parede celular, o que poderia explicar a ausência da proteína na sua superfície.

- Em células polarizadas, como conídios germinados ou blastosporos germinados, ocorre uma concentração da proteína nos pólos germinativos. Simplesmente pode estar ocorrendo um recrutamento da proteína para suprir funções básicas da célula, uma vez que a demanda energética em pólos germinativos é muito maior do que no restante da célula, ou pode haver o envolvimento em algum outro processo celular que esteja ocorrendo no local.

- A inibição drástica da adesão de conídios de *M. anisopliae* às asas de inseto, como resultado do tratamento dos conídios com o anti-soro anti-GAPDH, não pode ser explicada exclusivamente por uma possível função de adesina exercida pela proteína, pois a redundância da função é evidente. O envolvimento da proteína em algum outro processo básico da infecção inicial responderia melhor à inibição tão intensa da adesão.

- Os níveis de inibição da adesão em resposta ao tratamento da asa do inseto com a proteína GAPDH recombinante são coerentes com uma função da proteína no processo de adesão, uma vez que ocorre atuação somente nos receptores para a proteína no hospedeiro.

8. PERSPECTIVAS

Identificar se realmente existe o envolvimento da proteína GAPDH em outro processo celular que não a adesão.

Descrever a rota de secreção da proteína GAPDH.

Estudar em maior detalhe como a proteína GAPDH interage com componentes da superfície do hospedeiro, e com componentes internos do hospedeiro, e se possível, identificá-los.

9. REFERÊNCIAS

- Adamek L (1963) Submersed cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.). *Folia Microbiol (Praha)* 1963; 10: 255-257.
- Aharoni A, Gaidukov L, Khersonsky O, Mc QGS, Roodveldt C & Tawfik DS (2005) The 'evolvability' of promiscuous protein functions. *Nat Genet* 37: 73-76.
- Ahuatzi D, Herrero P, de la Cera T & Moreno F (2004) The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent. *J Biol Chem* 279: 14440-14446.
- Alvarez RA, Blaylock MW & Baseman JB (2003) Surface localized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Mycoplasma genitalium* binds mucin. *Mol Microbiol* 48: 1417-1425.
- Alves AM, Record E, Lomascolo A, Scholtmeijer K, Asther M, Wessels JG & Wosten HA (2004) Highly efficient production of laccase by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Environ Microbiol* 70: 6379-6384.
- Alves SB (1988) Controle microbiano de insetos. Ed. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2ª ed., Piracicaba.
- Appenzeller-Herzog C & Hauri HP (2006) The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J Cell Sci* 119: 2173-2183.
- Arruda W, Lubeck I, Schrank A & Vainstein MH (2005) Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Exp Appl Acarol* 37: 231-244.
- Babady NE, Pang YP, Elpeleg O & Isaya G (2007) Cryptic proteolytic activity of dihydrolipoamide dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6158-6163.
- Balsalobre C, Silvan JM, Berglund S, Mizunoe Y, Uhlin BE & Wai SN (2006) Release of the type I secreted alpha-haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 59: 99-112.
- Banerjee S, Nandyala AK, Raviprasad P, Ahmed N & Hasnain SE (2007) Iron-dependent RNA-binding activity of *Mycobacterium tuberculosis* aconitase. *J Bacteriol* 189: 4046-4052.
- Barbosa MS, Cunha Passos DA, Felipe MS, Jesuino RS, Pereira M & de Almeida Soares CM (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.
- Barbosa MS, Bao SN, Andreotti PF, et al. (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.
- Barker DF & Campbell AM (1981) Genetic and biochemical characterization of the *birA* gene and its product: evidence for a direct role of biotin holoenzyme synthetase in repression of the biotin operon in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 146: 469-492.

- Basilion JP, Rouault TA, Massinople CM, Klausner RD & Burgess WH (1994) The iron-responsive element-binding protein: localization of the RNA-binding site to the aconitase active-site cleft. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 574-578.
- Beard M, Satoh A, Shorter J & Warren G (2005) A cryptic Rab1-binding site in the p115 tethering protein. *J Biol Chem* **280**: 25840-25848.
- Bechet J, Greenson M & Wiame JM (1970) Mutations affecting the repressibility of arginine biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **12**: 31-39.
- Belinchon MM & Gancedo JM (2007) Glucose controls multiple processes in *Saccharomyces cerevisiae* through diverse combinations of signaling pathways. *FEMS Yeast Res* **7**: 808-818.
- Benndorf D, Muller A, Bock K, Manuwald O, Herbarth O & von Bergen M (2008) Identification of spore allergens from the indoor mould *Aspergillus versicolor*. *Allergy* **63**: 454-460.
- Bergmann S, Rohde M & Hammerschmidt S (2004) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein. *Infect Immun* **72**: 2416-2419.
- Bergmann S, Rohde M, Preissner KT & Hammerschmidt S (2005) The nine residue plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration. *Thromb Haemost* **94**: 304-311.
- Bethune J, Wieland F & Moelleken J (2006) COPI-mediated transport. *J Membr Biol* **211**: 65-79.
- Bhat PJ & Hopper JE (1992) Overproduction of the GAL1 or GAL3 protein causes galactose-independent activation of the GAL4 protein: evidence for a new model of induction for the yeast GAL/MEL regulon. *Mol Cell Biol* **12**: 2701-2707.
- Bi X, Corpina RA & Goldberg J (2002) Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature* **419**: 271-277.
- Bidochka MJ, St Leger R & Roberts DW (1997) Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, **171**:213-224.
- Bosch J, Buscaglia CA, Krumm B, *et al.* (2007) Aldolase provides an unusual binding site for thrombospondin-related anonymous protein in the invasion machinery of the malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7015-7020.
- Braga GU, Rangel DE, Flint SD, Anderson AJ & Roberts DW (2006) Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochem Photobiol* **82**: 418-422.
- Braig K, Otwinowski Z, Hegde R, Boisvert DC, Joachimiak A, Horwich AL & Sigler PB (1994) The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* **371**: 578-586.
- Bryksin AV & Laktionov PP (2008) Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in vesicular transport from golgi apparatus to endoplasmic reticulum. *Biochemistry (Mosc)* **73**: 619-625.
- Buscaglia CA, Coppens I, Hol WG & Nussenzweig V (2003) Sites of interaction between aldolase and thrombospondin-related anonymous protein in plasmodium. *Mol Biol Cell* **14**: 4947-4957.

- Carlson M (1999) Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol* **2**: 202-207.
- Cascalho M, Wong J, Steinberg C & Wabl M (1998) Mismatch repair co-opted by hypermutation. *Science* **279**: 1207-1210.
- Chambergo FS, Bonaccorsi ED, Ferreira AJ, *et al.* (2002) 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.
- Chaput M, Claes V, Portetelle D, *et al.* (1988) The neurotrophic factor neuroleukin is 90% homologous with phosphohexose isomerase. *Nature* **332**: 454-455.
- Chen XJ, Wang X, Kaufman BA & Butow RA (2005) Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science* **307**: 714-717.
- Chiou SH, Lo CH, Chang CY, Itoh T, Kaji H & Samejima T (1991) Ostrich crystallins. Structural characterization of delta-crystallin with enzymic activity. *Biochem J* **273(Pt 2)**: 295-300.
- Chu E, Koeller DM, Casey JL, *et al.* (1991) Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 8977-8981.
- Citron BA, Davis MD, Milstien S, Gutierrez J, Mendel DB, Crabtree GR & Kaufman S (1992) Identity of 4a-carbinolamine dehydratase, a component of the phenylalanine hydroxylation system, and DCoH, a transregulator of homeodomain proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 11891-11894.
- Clarkson JM & Charnley AK (1996) New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol* **4**: 197-203.
- Colell A, Ricci JE, Tait S, *et al.* (2007) GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell* **129**: 983-997.
- Crowe JD, Sievwright IK, Auld GC, Moore NR, Gow NA & Booth NA (2003) *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Mol Microbiol* **47**: 1637-1651.
- De Duve C, Wattiaux R & Baudhuin P (1962) Distribution of enzymes between subcellular fractions in animal tissues. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* **24**: 291-358.
- De Jesus M, Nicola AM, Rodrigues ML, Janbon G & Casadevall A (2009) Capsular localization of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide component galactoxylomannan. *Eukaryot Cell* **8**: 96-103.
- De Pereda JM, Waas WF, Jan Y, Ruoslahti E, Schimmel P & Pascual J (2004) Crystal structure of a human peptidyl-tRNA hydrolase reveals a new fold and suggests basis for a bifunctional activity. *J Biol Chem* **279**: 8111-8115.
- De Vit MJ, Waddle JA & Johnston M (1997) Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol Biol Cell* **8**: 1603-1618.
- Decker BL & Wickner WT (2006) Enolase activates homotypic vacuole fusion and protein transport to the vacuole in yeast. *J Biol Chem* **281**: 14523-14528.
- Dowhan W & Bogdanov M (2002) in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes* (Vance, D. E., and Vance, J. E., eds.) Elsevier.

- Dubois E & Messenguy F (1994) Pleiotropic function of ArgR11p (Arg82p), one of the regulators of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Role in expression of cell-type-specific genes. *Mol Gen Genet* **243**: 315-324.
- Dupuy J, Volbeda A, Carpentier P, Darnault C, Moulis JM & Fontecilla-Camps JC (2006) Crystal structure of human iron regulatory protein 1 as cytosolic aconitase. *Structure* **14**: 129-139.
- Dutra V, Nakazato L, Broetto L, Silveira Schrank I, Henning Vainstein M & Schrank A (2004) 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.
- Edgell DR, Derbyshire V, Van Roey P, *et al.* (2004) Intron-encoded homing endonuclease I-TevI also functions as a transcriptional autorepressor. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 936-944.
- Egea L, Aguilera L, Gimenez R, Sorolla MA, Aguilar J, Badia J & Baldoma L (2007) Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 1190-1203.
- Entelis N, Brandina I, Kamenski P, Krasheninnikov IA, Martin RP & Tarassov I (2006) A glycolytic enzyme, enolase, is recruited as a cofactor of tRNA targeting toward mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **20**: 1609-1620.
- Fagan T, Morse D & Hastings JW (1999) Circadian synthesis of a nuclear-encoded chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* is translationally controlled. *Biochemistry* **38**: 7689-7695.
- Faik P, Walker JI, Redmill AA & Morgan MJ (1988) Mouse glucose-6-phosphate isomerase and neuroleukin have identical 3' sequences. *Nature* **332**: 455-457.
- Farenhorst M, Farina D, Scholte EJ, Takken W, Hunt RH, Coetzee M & Knols BG (2008) African water storage pots for the delivery of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to the malaria vectors *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles funestus*. *Am J Trop Med Hyg* **78**: 910-916.
- Fernandez FB (2000) The employment of biological and non-chemical alternatives for insect plague control in sugarcane crops in Costa Rica. *International Sugar Journal*. 102: 482-490.
- Frazzon AP, da Silva Vaz Junior I, Masuda A, Schrank A & Vainstein MH (2000) In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* **94**: 117-125.
- Freund C, Kuhne R, Park S, Thiemke K, Reinherz EL & Wagner G (2003) Structural investigations of a GYF domain covalently linked to a proline-rich peptide. *J Biomol NMR* **27**: 143-149.
- Fu Y, Ibrahim AS, Sheppard DC, *et al.* (2002) *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. *Mol Microbiol* **44**: 61-72.
- Furukawa T, Yoshimura A, Sumizawa T, *et al.* (1992) Angiogenic factor. *Nature* **356**: 668.

- Gale CA, Bendel CM, McClellan M, Hauser M, Becker JM, Berman J & Hostetter MK (1998) Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science* **279**: 1355-1358.
- Gallione CJ & Rose JK (1985) A single amino acid substitution in a hydrophobic domain causes temperature-sensitive cell-surface transport of a mutant viral glycoprotein. *J Virol* **54**: 374-382.
- Gancedo JM (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 334-361.
- Glaser PE & Gross RW (1994) Plasmenylethanolamine facilitates rapid membrane fusion: a stopped-flow kinetic investigation correlating the propensity of a major plasma membrane constituent to adopt an HII phase with its ability to promote membrane fusion. *Biochemistry* **33**: 5805-5812.
- Glaser PE & Gross RW (1995) Rapid plasmenylethanolamine-selective fusion of membrane bilayers catalyzed by an isoform of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: discrimination between glycolytic and fusogenic roles of individual isoforms. *Biochemistry* **34**: 12193-12203.
- Glaser PE, Han X & Gross RW (2002) Tubulin is the endogenous inhibitor of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoform that catalyzes membrane fusion: Implications for the coordinated regulation of glycolysis and membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14104-14109.
- Greene AV, Keller N, Haas H & Bell-Pedersen D (2003) A circadian oscillator in *Aspergillus* spp. regulates daily development and gene expression. *Eukaryot Cell* **2**: 231-237.
- Gregory TR (2005) Synergy between sequence and size in large-scale genomics. *Nat Rev Genet* **6**: 699-708.
- Grosshans BL, Ortiz D & Novick P (2006) Rab5 and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11821-11827.
- Guo B, Styles CA, Feng Q & Fink GR (2000) A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12158-12163.
- Gurney ME, Heinrich SP, Lee MR & Yin HS (1986) Molecular cloning and expression of neuroleukin, a neurotrophic factor for spinal and sensory neurons. *Science* **234**: 566-574.
- Gurney ME, Apatoff BR, Spear GT, Baumel MJ, Antel JP, Bania MB & Reder AT (1986) Neuroleukin: a lymphokine product of lectin-stimulated T cells. *Science* **234**: 574-581.
- Hadley NF (1981) Fine structure of the cuticle of the black widow spider with reference to surface lipids. *Tissue Cell* **13**: 805-817.
- Hall DA, Zhu H, Zhu X, Royce T, Gerstein M & Snyder M (2004) Regulation of gene expression by a metabolic enzyme. *Science* **306**: 482-484.
- Hanna J, Hathaway NA, Tone Y, *et al.* (2006) Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation. *Cell* **127**: 99-111.
- Hara MR & Snyder SH (2006) Nitric oxide-GAPDH-Siah: a novel cell death cascade. *Cell Mol Neurobiol* **26**: 527-538.

- Hardy SP, Goodfellow HR, Valverde MA, Gill DR, Sepulveda V & Higgins CF (1995) Protein kinase C-mediated phosphorylation of the human multidrug resistance P-glycoprotein regulates cell volume-activated chloride channels. *EMBO J* **14**: 68-75.
- Hendriks W, Mulders JW, Bibby MA, Slingsby C, Bloemendal H & de Jong WW (1988) Duck lens epsilon-crystallin and lactate dehydrogenase B4 are identical: a single-copy gene product with two distinct functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 7114-7118.
- Hernandez-Fonseca K & Massieu L (2005) Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* **82**: 196-205.
- Herrero P, Martinez-Campa C & Moreno F (1998) The hexokinase 2 protein participates in regulatory DNA-protein complexes necessary for glucose repression of the SUC2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **434**: 71-76.
- Herrero P, Galindez J, Ruiz N, Martinez-Campa C & Moreno F (1995) Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HXK1, HXK2 and GLK1 genes. *Yeast* **11**: 137-144.
- Hittinger CT & Carroll SB (2007) Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch. *Nature* **449**: 677-681.
- Hoelzle LE, Hoelzle K, Helbling M, *et al.* (2007) MSG1, a surface-localised protein of *Mycoplasma suis* is involved in the adhesion to erythrocytes. *Microbes Infect* **9**: 466-474.
- Holder DJ & Keyhani NO (2005) Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5260-5266.
- Hsiao YM & Ko JL (2001) Determination of destruxins, cyclic peptide toxins, produced by different strains of *Metarhizium anisopliae* and their mutants induced by ethyl methane sulfonate and ultraviolet using HPLC method. *Toxicon* **39**: 837-841.
- Huang Y, Bayfield MA, Intine RV & Maraia RJ (2006) Separate RNA-binding surfaces on the multifunctional La protein mediate distinguishable activities in tRNA maturation. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 611-618.
- Huberts DH & van der Klei IJ (2010) Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochim Biophys Acta* **1803**: 520-525.
- Hunter DM, Milner RJ & Spurgin PA (2001) Aerial treatment of the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera* (Orthoptera: Acrididae) with *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Bull Entomol Res* **91**: 93-99.
- Jang HH, Lee KO, Chi YH, *et al.* (2004) Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* **117**: 625-635.
- Jarrold SL, Moore D, Potter U & Charnley AK (2007) The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycol Res* **111**: 240-249.
- Jeffery CJ (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* **24**: 8-11.
- Jeffery CJ (2005) Mass spectrometry and the search for moonlighting proteins. *Mass Spectrom Rev* **24**: 772-782.
- Johnston M (1999) Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet* **15**: 29-33.

- Juárez MP & Fernández GC (2007) Cuticular hydrocarbons of triatomines. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **2007 jul**: 711-730.
- Kaaya GP & Munyinyi DM (1995) Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. *J Invertebr Pathol* **1995 nov**: 237-241.
- Kaaya GP, Mwangi EN & Ouna EA (1996) Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol* **67**: 15-20.
- Kanga LH, Jones WA & James RR (2003) Field trials using the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Journal of Economic Entomology* **96**: 1091-1099.
- Kennedy MC, Mende-Mueller L, Blondin GA & Beinert H (1992) Purification and characterization of cytosolic aconitase from beef liver and its relationship to the iron-responsive element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 11730-11734.
- Kinoshita H, Wakahara N, Watanabe M, *et al.* (2008) Cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) of *Lactobacillus plantarum* LA 318 recognizes human A and B blood group antigens. *Res Microbiol* **159**: 685-691.
- Kinoshita H, Uchida H, Kawai Y, *et al.* (2008) Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin. *J Appl Microbiol* **104**: 1667-1674.
- Klionsky DJ, Herman PK & Emr SD (1990) The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol Rev* **54**: 266-292.
- Kuehn MJ & Kesty NC (2005) Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* **19**: 2645-2655.
- Kumagai H & Sakai H (1983) A porcine brain protein (35 K protein) which bundles microtubules and its identification as glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *J Biochem* **93**: 1259-1269.
- Kunert A, Losse J, Gruszyn C, *et al.* (2007) Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *J Immunol* **179**: 2979-2988.
- Kuo CY, Chou SY & Huang CT (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.
- Lama A, Kucknoor A, Mundodi V & Alderete JF (2009) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* **77**: 2703-2711.
- Larsen GG, Appel KF, Wolff AM, Nielsen J & Arnau J (2004) Characterisation of the *Mucor circinelloides* regulated promoter *gpd1P*. *Curr Genet* **45**: 225-234.
- Lenz LL, Mohammadi S, Geissler A & Portnoy DA (2003) SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 12432-12437.

- Li J & Feng MG (2009) Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. *Mycol Res* **113**: 93-99.
- Lippincott-Schwartz J, Cole NB, Marotta A, Conrad PA & Bloom GS (1995) Kinesin is the motor for microtubule-mediated Golgi-to-ER membrane traffic. *J Cell Biol* **128**: 293-306.
- Lohr D, Venkov P & Zlatanova J (1995) Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *FASEB J* **9**: 777-787.
- Lord JC (2005) From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. *J Invertebr Pathol* **89**: 19-29.
- Lord JC & Howard RW (2004) A proposed role for the cuticular fatty amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. *Mycopathologia* **158**: 211-217.
- Low PS, Rathinavelu P & Harrison ML (1993) Regulation of glycolysis via reversible enzyme binding to the membrane protein, band 3. *J Biol Chem* **268**: 14627-14631.
- Lu GT, Xie JR, Chen L, *et al.* (2009) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is required for extracellular polysaccharide production and full virulence. *Microbiology* **155**: 1602-1612.
- Lu M, Holliday LS, Zhang L, Dunn WA, Jr. & Gluck SL (2001) Interaction between aldolase and vacuolar H⁺-ATPase: evidence for direct coupling of glycolysis to the ATP-hydrolyzing proton pump. *J Biol Chem* **276**: 30407-30413.
- Lu M, Ammar D, Ives H, Albrecht F & Gluck SL (2007) Physical interaction between aldolase and vacuolar H⁺-ATPase is essential for the assembly and activity of the proton pump. *J Biol Chem* **282**: 24495-24503.
- Lubeck I, Arruda W, Souza BK, Stanisçuaski F, Carlin CR, Schrank A & Vainstein MH (2008) Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Ecol* **1**: 78-88.
- Luckie DB, Krouse ME, Harper KL, Law TC & Wine JJ (1994) Selection for MDR1/P-glycoprotein enhances swelling-activated K⁺ and Cl⁻ currents in NIH/3T3 cells. *Am J Physiol* **267**: C650-658.
- Luz C, Tigano MS, Silva IG, Cordeiro CM & Aljanabi SM (1998) Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **93**: 839-846.
- Mark DF & Richardson CC (1976) Escherichia coli thioredoxin: a subunit of bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 780-784.
- Markova NG, Pinkas-Sarafova A & Simon M (2006) A metabolic enzyme of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily may moonlight in the nucleus as a repressor of promoter activity. *J Invest Dermatol* **126**: 2019-2031.
- Marques EJ, Villas-Boas AM & Pereira CEF (1981) Orientações técnicas para a produção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Em laboratórios setoriais. PLANALSUCAR, Boletim técnico n.3. 5-23.

- Martin RP, Schneller JM, Stahl AJ & Dirheimer G (1979) Import of nuclear deoxyribonucleic acid coded lysine-accepting transfer ribonucleic acid (anticodon C-U-U) into yeast mitochondria. *Biochemistry* **18**: 4600-4605.
- McFadden D, Zaragoza O & Casadevall A (2006) The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol* **14**: 497-505.
- McFadden DC, De Jesus M & Casadevall A (2006) The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. *J Biol Chem* **281**: 1868-1875.
- Melo IS & Azevedo JL (1998) Controle Biológico, volume I. Ed. EMBRAPA, 262p.
- Meyer-Siegler K, Mauro DJ, Seal G, Wurzer J, deRiel JK & Sirover MA (1991) A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 8460-8464.
- Meyer J, Walker-Jonah A & Hollenberg CP (1991) Galactokinase encoded by GAL1 is a bifunctional protein required for induction of the GAL genes in *Kluyveromyces lactis* and is able to suppress the gal3 phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**: 5454-5461.
- Mitsuzawa H, Kimura M, Kanda E & Ishihama A (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, Nielsen HB, Hofmann G & Nielsen J (2006) 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.
- Morero RD, Vinals AL, Bloj B & Farias RN (1985) Fusion of phospholipid vesicles induced by muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the absence of calcium. *Biochemistry* **24**: 1904-1909.
- Morre DJ, Chueh PJ, Pletcher J, Tang X, Wu LY & Morre DM (2002) Biochemical basis for the biological clock. *Biochemistry* **41**: 11941-11945.
- Mowbray SL & Koshland DE, Jr. (1990) Mutations in the aspartate receptor of *Escherichia coli* which affect aspartate binding. *J Biol Chem* **265**: 15638-15643.
- Muro-Pastor AM, Ostrovsky P & Maloy S (1997) Regulation of gene expression by repressor localization: biochemical evidence that membrane and DNA binding by the PutA protein are mutually exclusive. *J Bacteriol* **179**: 2788-2791.
- Nielsen TK, Liu S, Luhrmann R & Ficner R (2007) Structural basis for the bifunctionality of the U5 snRNP 52K protein (CD2BP2). *J Mol Biol* **369**: 902-908.
- Nimrichter L, Rodrigues ML, Rodrigues EG & Travassos LR (2005) The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. *Microbes Infect* **7**: 789-798.
- Ostrovsky de Spicer P & Maloy S (1993) PutA protein, a membrane-associated flavin dehydrogenase, acts as a redox-dependent transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 4295-4298.
- Ozimek P, Kotter P, Veenhuis M & van der Klei IJ (2006) *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae* Pex5p's recognize different,

- independent peroxisomal targeting signals in alcohol oxidase. *FEBS Lett* **580**: 46-50.
- Ozimek P, van Dijk R, Latchev K, Gancedo C, Wang DY, van der Klei IJ & Veenhuis M (2003) Pyruvate carboxylase is an essential protein in the assembly of yeast peroxisomal oligomeric alcohol oxidase. *Mol Biol Cell* **14**: 786-797.
- Pachlinger R, Mitterbauer R, Adam G & Strauss J (2005) Metabolically independent and accurately adjustable *Aspergillus* sp. expression system. *Appl Environ Microbiol* **71**: 672-678.
- Pal S, St Leger RJ & Wu LP (2007) Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* **282**: 8969-8977.
- Pancholi V & Fischetti VA (1992) A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med* **176**: 415-426.
- Pedrini N, Crespo R & Juarez MP (2007) Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **146**: 124-137.
- Philpott CC, Klausner RD & Rouault TA (1994) The bifunctional iron-responsive element binding protein/cytosolic aconitase: the role of active-site residues in ligand binding and regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 7321-7325.
- Piatigorsky J (1998) Multifunctional lens crystallins and corneal enzymes. More than meets the eye. *Ann N Y Acad Sci* **842**: 7-15.
- Piatigorsky J & Wistow GJ (1989) Enzyme/crystallins: gene sharing as an evolutionary strategy. *Cell* **57**: 197-199.
- Piatigorsky J, O'Brien WE, Norman BL, *et al.* (1988) Gene sharing by delta-crystallin and argininosuccinate lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 3479-3483.
- Platt A, Ross HC, Hankin S & Reece RJ (2000) The insertion of two amino acids into a transcriptional inducer converts it into a galactokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3154-3159.
- Presley JF, Cole NB, Schroer TA, Hirschberg K, Zaal KJ & Lippincott-Schwartz J (1997) ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* **389**: 81-85.
- Qi Y, He X, Wang XJ, Kohany O, Jurka J & Hannon GJ (2006) Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* **443**: 1008-1012.
- Randez-Gil F, Herrero P, Sanz P, Prieto JA & Moreno F (1998) Hexokinase PII has a double cytosolic-nuclear localisation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **425**: 475-478.
- Rinas U & Hoffmann F (2004) Selective leakage of host-cell proteins during high-cell-density cultivation of recombinant and non-recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* **20**: 679-687.
- Robbins AR, Ward RD & Oliver C (1995) A mutation in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase alters endocytosis in CHO cells. *J Cell Biol* **130**: 1093-1104.
- Roberts DW & St Leger RJ (2004) *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Adv Appl Microbiol* **2004**: 1-70.

- Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD, Almeida IC & Casadevall A (2008) Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* **7**: 58-67.
- Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, *et al.* (2007) Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot Cell* **6**: 48-59.
- Rodriguez A, De La Cera T, Herrero P & Moreno F (2001) The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **355**: 625-631.
- Roghi C & Allan VJ (1999) Dynamic association of cytoplasmic dynein heavy chain 1a with the Golgi apparatus and intermediate compartment. *J Cell Sci* **112 (Pt 24)**: 4673-4685.
- Rubio-Teixeira M (2005) A comparative analysis of the GAL genetic switch between not-so-distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* **5**: 1115-1128.
- Saier MH, Jr. (2006) Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J Membr Biol* **214**: 75-90.
- Scheerer P, Borchert A, Krauss N, Wessner H, Gerth C, Hohne W & Kuhn H (2007) Structural basis for catalytic activity and enzyme polymerization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-4 (GPx4). *Biochemistry* **46**: 9041-9049.
- Schmid F, Separovic F, McDougall BM, Stone BA, Brownlee RT & Seviour RJ (2007) Characterisation of the extracellular polysaccharides produced by isolates of the fungus *Acremonium*. *Carbohydr Res* **342**: 2481-2483.
- Scholte EJ, Knols BG & Takken W (2006) Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *J Invertebr Pathol* **2006 Jan**: 43-49.
- Scholte EJ, Takken W & Knols BG (2007) Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Trop* **2007 Jun**: 151-158.
- Scholte EJ, Njiru BN, Smallegange RC, Takken W & Knols BG (2003) Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malar J* **2**: 29.
- Schrank A & Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*.
- Screen S, Bailey A, Charnley K, Cooper R & Clarkson J (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.
- Sellick CA, Jowitt TA & Reece RJ (2009) The effect of ligand binding on the galactokinase activity of yeast Gal1p and its ability to activate transcription. *J Biol Chem* **284**: 229-236.
- Sha J, Galindo CL, Pancholi V, Popov VL, Zhao Y, Houston CW & Chopra AK (2003) Differential expression of the enolase gene under in vivo versus in vitro growth conditions of *Aeromonas hydrophila*. *Microb Pathog* **34**: 195-204.

- Sherlock IA & Guitton N (1982) Observações sobre a ação do fungo *Metarhizium anisopliae* Metsch. sobre algumas espécies de Triatomidae (Hemiptera, Reduviidae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. 24: 234-39.
- Shimajima M, Hoffmann-Benning S, Garavito RM & Benning C (2005) Ferredoxin-dependent glutamate synthase moonlights in plant sulfolipid biosynthesis by forming a complex with SQD1. *Arch Biochem Biophys* **436**: 206-214.
- Shinohara ML, Loros JJ & Dunlap JC (1998) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is regulated on a daily basis by the circadian clock. *J Biol Chem* **273**: 446-452.
- Silva JC & Messias CL (1986) Virulence of mutants and revertants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* toward *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 48: 368-74.
- Silva WO, Mitidieri A, Schrank A & Vainstein MH (2004) Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry* **40**: 321-326.
- Silva WOB, Santi L, Schrank A & Vainstein MH (2009) *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus infection. *Mycol. Res.* doi:10.1016/j.mycres. 2009.08.003.
- Sirover MA (2005) New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J Cell Biochem* **95**: 45-52.
- Smith FC, Davies SP, Wilson WA, Carling D & Hardie DG (1999) The SNF1 kinase complex from *Saccharomyces cerevisiae* phosphorylates the transcriptional repressor protein Mig1p in vitro at four sites within or near regulatory domain 1. *FEBS Lett* **453**: 219-223.
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G & Klagsbrun M (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* **92**: 735-745.
- Sonnichsen B, Lowe M, Levine T, Jamsa E, Dirac-Svejstrup B & Warren G (1998) A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J Cell Biol* **140**: 1013-1021.
- Springer S, Spang A & Schekman R (1999) A primer on vesicle budding. *Cell* **97**: 145-148.
- Sriram G, Martinez JA, McCabe ER, Liao JC & Dipple KM (2005) Single-gene disorders: what role could moonlighting enzymes play? *Am J Hum Genet* **76**: 911-924.
- St Leger RJ, Cooper RM & Charnley AK (1991) Characterization of chitinase and chitinase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 58: 415-426.
- St Leger RJ, Butt TM, Staples RC & Roberts DW (1990) Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of General Microbiology* 1779-1789.
- St Leger RJ, Goettel MS, Roberts DW & Staples RC (1991) Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 168-179.
- Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC & Boucher RC (1995) CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* **269**: 847-850.

- Tarze A, Deniaud A, Le Bras M, *et al.* (2007) GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene* **26**: 2606-2620.
- ter Kuile BH & Westerhoff HV (2001) Transcriptome meets metabolome: hierarchical and metabolic regulation of the glycolytic pathway. *FEBS Lett* **500**: 169-171.
- Terao Y, Yamaguchi M, Hamada S & Kawabata S (2006) Multifunctional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pyogenes* is essential for evasion from neutrophils. *J Biol Chem* **281**: 14215-14223.
- Tisdale EJ (1999) A Rab2 mutant with impaired GTPase activity stimulates vesicle formation from pre-Golgi intermediates. *Mol Biol Cell* **10**: 1837-1849.
- Tisdale EJ (2000) Rab2 requires PKC ι/λ to recruit beta-COP for vesicle formation. *Traffic* **1**: 702-712.
- Tisdale EJ (2001) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is required for vesicular transport in the early secretory pathway. *J Biol Chem* **276**: 2480-2486.
- Tisdale EJ (2002) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated by protein kinase C ι/λ and plays a role in microtubule dynamics in the early secretory pathway. *J Biol Chem* **277**: 3334-3341.
- Tisdale EJ (2005) Rab2 purification and interaction with protein kinase C ι/λ and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Methods Enzymol* **403**: 381-391.
- Tisdale EJ & Jackson MR (1998) Rab2 protein enhances coatomer recruitment to pre-Golgi intermediates. *J Biol Chem* **273**: 17269-17277.
- Tisdale EJ & Artalejo CR (2006) Src-dependent protein kinase C ι/λ (aPKC ι/λ) tyrosine phosphorylation is required for aPKC ι/λ association with Rab2 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on pre-golgi intermediates. *J Biol Chem* **281**: 8436-8442.
- Tisdale EJ, Kelly C & Artalejo CR (2004) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with Rab2 and plays an essential role in endoplasmic reticulum to Golgi transport exclusive of its glycolytic activity. *J Biol Chem* **279**: 54046-54052.
- Tisdale EJ, Bourne JR, Khosravi-Far R, Der CJ & Balch WE (1992) GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J Cell Biol* **119**: 749-761.
- Tounou AK, Kooyman C, Douro-Kpindou OK & Poehling HM (2008) Interaction between *Paranosema locustae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*, two pathogens of the desert locust, *Schistocerca gregaria* under laboratory conditions. *J Invertebr Pathol* **97**: 203-210.
- Treitel MA, Kuchin S & Carlson M (1998) Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **18**: 6273-6280.
- Van Roey P, Waddling CA, Fox KM, Belfort M & Derbyshire V (2001) Intertwined structure of the DNA-binding domain of intron endonuclease I-TevI with its substrate. *EMBO J* **20**: 3631-3637.

- Volker KW & Knull HR (1993) Glycolytic enzyme-tubulin interactions: role of tubulin carboxy terminals. *J Mol Recognit* **6**: 167-177.
- Vu TK, Hung DT, Wheaton VI & Coughlin SR (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **64**: 1057-1068.
- Wai SN, Lindmark B, Soderblom T, *et al.* (2003) Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell* **115**: 25-35.
- Walden WE, Selezneva AI, Dupuy J, Volbeda A, Fontecilla-Camps JC, Theil EC & Volz K (2006) Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. *Science* **314**: 1903-1908.
- Wang C & St Leger RJ (2007) The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryot Cell* **6**: 808-816.
- Wang C, Skrobek A & Butt TM (2003) Concurrence of losing a chromosome and the ability to produce destruxins in a mutant of *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett* **226**: 373-378.
- Wang C, Hu G & St Leger RJ (2005) Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genet Biol* **42**: 704-718.
- Wang J, Morris AJ, Tolan DR & Pagliaro L (1996) The molecular nature of the F-actin binding activity of aldolase revealed with site-directed mutants. *J Biol Chem* **271**: 6861-6865.
- Watanabe H, Takehana K, Date M, Shinozaki T & Raz A (1996) Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide. *Cancer Res* **56**: 2960-2963.
- Wistow GJ, Lietman T, Williams LA, Stapel SO, de Jong WW, Horwitz J & Piatigorsky J (1988) Tau-crystallin/alpha-enolase: one gene encodes both an enzyme and a lens structural protein. *J Cell Biol* **107**: 2729-2736.
- Wolff AM & Arnau J (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.
- Wolff C & Parkinson JS (1988) Aspartate taxis mutants of the *Escherichia coli* tar chemoreceptor. *J Bacteriol* **170**: 4509-4515.
- Wool IG (1996) Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci* **21**: 164-165.
- Wooster MS & Wrigglesworth JM (1976) Modification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase activity by adsorption on phospholipid vesicles. *Biochem J* **159**: 627-631.
- Wooster MS & Wrigglesworth JM (1976) Adsorption of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase on condensed monolayers of phospholipid. *Biochem J* **153**: 93-100.
- Wright C, Brooks A & Wall R (2004) Toxicity of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to adult females of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Pest Manag Sci* **60**: 639-644.

- Xu W, Seiter K, Feldman E, Ahmed T & Chiao JW (1996) The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology with neuroleukin or phosphoglucose isomerase. *Blood* **87**: 4502-4506.
- Yan H, Lou MF, Fernando MR & Harding JJ (2006) Thioredoxin, thioredoxin reductase, and alpha-crystallin revive inactivated glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase in human aged and cataract lens extracts. *Mol Vis* **12**: 1153-1159.
- Yi Liu Z, Liang ZQ, Whalley AJ, Yao YJ & Liu AY (2001) Cordyceps brittlebankisoides, a new pathogen of grubs and its anamorph, Metarrhizium anisopliae var. majus. *J Invertebr Pathol* **78**: 178-182.
- Yoshida N, Oeda K, Watanabe E, *et al.* (2001) Protein function. Chaperonin turned insect toxin. *Nature* **411**: 44.
- Zacharuk RY (1971) Fine structure of the fungus *Metarrhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). IV. Development within the host. *Can J Microbiol* **525**-529.
- Zhang A, Xie C, Chen H & Jin M (2008) Identification of immunogenic cell wall-associated proteins of *Streptococcus suis* serotype 2. *Proteomics* **8**: 3506-3515.
- Zhang C, Yu L & Qian R (2007) Characterization of OmpK, GAPDH and their fusion OmpK-GAPDH derived from *Vibrio harveyi* outer membrane proteins: their immunoprotective ability against vibriosis in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *J Appl Microbiol* **103**: 1587-1599.
- Zhao B, Lei L, Vassilyev DG, *et al.* (2009) Crystal structure of albaflavenone monooxygenase containing a moonlighting terpene synthase active site. *J Biol Chem* **284**: 36711-36719.
- Zheng L, Roeder RG & Luo Y (2003) 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.
- Zhioua E, Browning M, Johnson PW, Ginsberg HS & LeBrun RA (1997) Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarrhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Parasitol* **83**: 815-818.
- Zimmermann FK & Scheel I (1977) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to carbon catabolite repression. *Mol Gen Genet* **154**: 75-82.

ANEXO 1

Artigo aceito para a publicação na *FEMS Microbiology Letter* intitulado:

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the entomopathogenic fungus
Metarhizium
anisopliae: cell-surface localization and role on host adhesion

RESEARCH LETTER

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: cell-surface localization and role in host adhesion

Leonardo Broetto¹, Walter O. Beys da Silva¹, Alexandre Melo Bailão², Célia de Almeida Soares², Marilene Henning Vainstein¹ & Augusto Schrank¹

¹Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBiot/UFRGS), Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; and ²Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB IB), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia-Goiás, Brazil

Correspondence: Augusto Schrank, Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBiot/UFRGS), Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), Av. Bento Gonçalves, 9500 – Bloco IV, Prédio 43-421, Bairro Agronomia, CEP 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Tel.: +55 51 3308 6071; fax: +55 51 3308 7309, e-mail: aschrank@cbiot.ufrgs.br

Received 6 July 2010; revised 19 August 2010; accepted 21 August 2010.

DOI:10.1111/j.1574-6968.2010.02103.x

Editor: Richard Staples

Keywords

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Metarhizium anisopliae*; biological control agent; glycolysis; cell surface.

Introduction

Metarhizium anisopliae is a filamentous fungus with the ability to infect and kill a wide range of arthropod hosts. Most frequently isolated from soil, the wide occurrence of *M. anisopliae* and its broad spectrum of action make this fungus an effective biological control agent and an important model to study the infection process in arthropods (Bischoff *et al.*, 2009).

The *M. anisopliae* infection process has frequently been studied and is a main focus of investigation (Schrank & Vainstein, 2010). Formerly, a search for differentially expressed sequences from *M. anisopliae* during tick cuticle infection revealed one gene with similarity to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (coding GAPDH, EC 1.2.1.12) from other closely related fungi (Dutra *et al.*,

Abstract

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a classic glycolytic enzyme that plays important roles in various cellular processes. Here, we report the sequence and transcriptional analyses of a regulated gene (*gpdh1*) encoding GAPDH in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, a well-characterized biocontrol agent of a wide range of arthropod pests. Transcript and protein analyses of the *gpdh1* showed a carbohydrate-dependent expression pattern in response to different carbon sources. A demonstration that GAPDH is localized at the cell surface is presented, and assays with insect wings show that this protein has adhesion-like activity. These results imply that GAPDH adhesion to the wing surface is specific and may play a role in the binding of conidia to a host. Our observations indicate new roles for GAPDH both physiologically and during the entomopathogen–host interaction.

2004). GAPDH is essential in the glycolysis/gluconeogenesis pathway. The enzyme is a homotetramer, each subunit with a molecular weight (MW) of 36 kDa. Studies have demonstrated some unforeseen, non-glycolytic functions of GAPDH in both physiological and pathological processes (Kim & Dang, 2005; Sirover, 2005; Bryksin & Laktionov, 2008). Moreover, in some pathogens such as fungi, bacteria and protozoa, GAPDH was found mostly on the cell surface, where it may play diverse roles in host–pathogen interactions (Crowe *et al.*, 2003; Barbosa *et al.*, 2006; Terao *et al.*, 2006; Egea *et al.*, 2007; Hoelzle *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007, 2008a; Kinoshita *et al.*, 2008; Lama *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2009).

In the present study, we characterized the GAPDH ortholog in *M. anisopliae*, and showed its expression pattern in different carbon sources and conditions that mimic

arthropod infection. The native protein was identified and its localization was demonstrated on the *M. anisopliae* cell surface of conidia, appressoria, mycelia, blastospores and germinated blastospores. The possible role of GAPDH as an adhesin using insect wings as a model was also assessed.

Materials and methods

Organisms and culture conditions

Metarhizium anisopliae var. *anisopliae* strain E6 was isolated from spittlebug (*Deois flavopicta*) from the state of Espírito Santo, Brazil, and was held as described by Bogo *et al.* (1998).

RNA extraction and Northern blot analysis

The total RNA, extracted from mycelium according to Dutra *et al.* (2004), from fungal cultures in glucose-, glycerol- or ethanol-amended CM (Cove's Medium) liquid medium, was used in Northern blot experiments. The mycelium was transferred to a liquid medium containing 0.6% w/v NaNO₃ amended with either 1% w/v glucose, 2% v/v glycerol or 5% v/v ethanol and incubated at 28 °C for 4 h or amended with either 1% w/v chitin or 1% w/v *Rhipicephalus microplus* exoskeleton and incubated for 48 h in a liquid medium at 28 °C.

Electrophoretic and Western blot analysis

Protein extracts were prepared from *M. anisopliae* grown in CM medium for 24 h at 28 °C and then transferred to CM medium amended with (1% w/v glucose, 2% v/v glycerol or 5% v/v ethanol) for a further 6 h. After precipitation with trichloroacetic acid 10% w/v, 2 mg of proteins were focused isoelectrically in a 17 cm pH 5–8 Bio-Rad strip, after which the second dimension was performed in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 12%. For Western blots, the proteins were transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane and GAPDH was detected with a polyclonal antiserum raised against the recombinant GAPDH from *Paracoccidioides brasiliensis* (Barbosa *et al.*, 2006).

Amino acid sequence determination of GAPDH

Samples of the cellular extracts were fractionated by two-dimensional (2-D) SDS-PAGE, and the proteins were electrotransferred overnight at 100 mA to PVDF membranes. The 36-kDa, pI-7.0 spot was excised from the gel, trypsin digested and subjected to MS (LC-MS/MS) analysis. The amino acid sequences were obtained via Mascot analysis (carbamidomethyl as fixed modifications; oxidation as variable modifications; ±0.1 Da peptide tolerance; ±0.1 Da MS/MS tolerance; +1, +2 and +3 peptide charge; mono-isotopic) using the NCBIInr database.

GAPDH detection by immunofluorescence microscopy

Conidia were harvested from 10-day-old plate cultures. Appressoria were isolated from 16 h cultures in a 0.04% yeast extract only source medium cultivated on coverslips. Mycelia were cultivated on CM at 28 °C for 24 h. Blastospore cells were isolated from cultures in Adamek medium (Adamek, 1963) at 28 °C for 64 h and, after this time period, 3 h of cultivation in CM was carried out to obtain late germinated blastospores. Cells were fixed in 3.7% formaldehyde overnight at 4 °C. After incubation in blocking buffer for 1 h at 37 °C, cells were incubated with a polyclonal antiserum raised against the recombinant protein from *P. brasiliensis* at a 1 : 100 dilution for 1 h. After this, the cells were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) 1 : 50 for 1 h at 37 °C. Slides were observed under a Zeiss immunofluorescence microscope.

Enzyme activities and fluorescence of immunolabeled GAPDH in conidia

GAPDH activity was measured spectrophotometrically at 340 nm following the increase in absorbance due to NADH formation. To determine the enzymatic activity of GAPDH on the external conidial surface, samples were obtained from protein extracts as described in Silva *et al.* (2009). Conidial cell integrity was confirmed by microscopy and the enzymatic activity of the proteins from cell-surface GAPDH was measured in a 20-min assay. Quantitative fluorescence measurements of immunolabeled GAPDH protein on conidia were also obtained. For this, 10⁸ intact and disrupted conidia were incubated with a polyclonal antiserum as above. Then, cells were incubated with FITC-conjugated anti-rabbit IgG 1 : 50 for 1 h at 37 °C. Fluorescence at 525 nm was measured in a microplate reader Spectramax M2^e (Molecular Devices, Sunnyvale). Conidia macerated with liquid nitrogen were used as a sample of the total (extra- and intracellular) GAPDH protein. Conidia without an immunolabeling treatment were used as the negative control.

Adherence assays

Conidial suspensions of a wild-type (WT) green fluorescent protein expressing *M. anisopliae* (2×10^7 conidia mL⁻¹) were used to treat insect wings by immersion for 20 s. The wings from *Dysdercus peruvianus* disinfected previously in 37% H₂O₂ were placed on the surface of 0.7% water agar and incubated for 8 h at 28 °C to induce conidial swelling and germination. The conidia were counted in five objective fields under a fluorescence microscope and recorded with three replicates of wings. The conidia were counted before and after washing in 0.05% Tween 20 for 30 s. The following treatments were performed: (1) before immersion of the

wings in the conidial suspension – preincubation with bovine serum albumin (BSA) ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 1 h at 37°C and preincubation with recombinant GAPDH ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$; from *M. anisopliae*, Supporting Information, Appendix S1) for 1 h at 37°C ; (2) conidial suspension was treated before immersion of the wings – with anti-CHI2 antisera (1:100) for 1 h at 37°C and anti-GAPDH antiserum (1:100, produced with *P. brasiliensis* GAPDH). Experiments were in triplicate; the means and SEs were determined. Statistical analysis was performed using a *t*-test. *P* values of 0.0001 or less were considered statistically significant.

Results

Molecular cloning and analysis of *gpdh1* from *M. anisopliae*

The ORF from *gpdh1* (GenBank accession number EF050456) predicts a 338 amino acid protein with an estimated MW of 36 kDa and a theoretical *pI* of 8.26. *In silico* protein domain analysis found no domain other than the expected NAD-binding domain (from Val4 to Cys151) and the C-terminal domain (from Leu156 to Tyr313) typical of GAPDH (Figs 1 and S1; Appendix S2). The putative *M. anisopliae* GAPDH sequence had high identity and similarity values with fungal counterparts (Table S1), and a phylogenetic tree was built (Fig. S2) showing a distribution consistent with other orthologs and one intron at a conserved position (Ridder & Osiewacz, 1992; Templeton *et al.*, 1992; Jungehulsing *et al.*, 1994). The *M. anisopliae gpdh1* gene is a single copy (Fig. 1a).

Metarhizium anisopliae GAPDH protein identification

To characterize possible isoforms of the GAPDH in *M. anisopliae*, cell extracts were analyzed by 2-D gel electrophoresis [Fig. 1b (A)]. The immunodetection of native GAPDH isoforms was performed using anti-GAPDH *P. brasiliensis* polydonal antiserum. The Western blot revealed three reactive isoforms, with *pI*s of 6.6, 6.8 and 7.0 [Fig. 1b (B)].

A protein with a molecular mass of 36 kDa and *pI* 7.0 was excised from 2-D gel electrophoresis blots of *M. anisopliae* mycelial protein extracts. Amino acid sequences of internal peptides with a high protein score derived from the ion scores (1326) to fungal GAPDH, and 67% of sequence coverage were obtained via Mascot analysis (Table S2), showing the anti-GAPDH antiserum specificity against *M. anisopliae* GAPDH.

Physiological regulation of the *gpdh1* gene and the cognate protein in *M. anisopliae*

The transcription pattern of the *M. anisopliae gpdh1* gene in response to different carbon sources (glucose, glycerol or ethanol as the sole carbon sources) was analyzed using

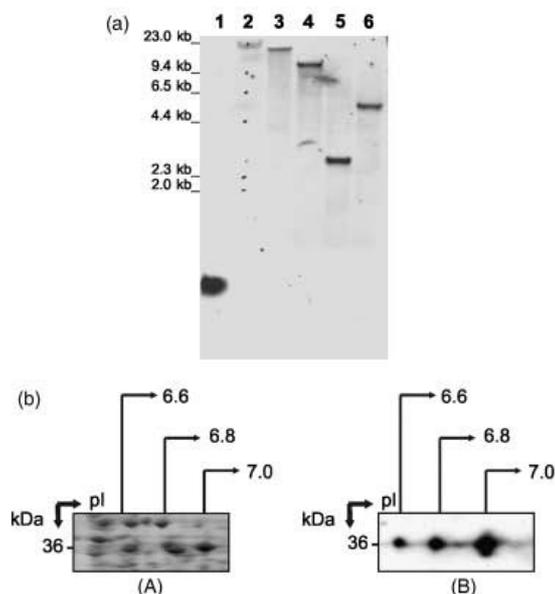


Fig. 1. Gene copy number and isoforms of GAPDH. (a) Southern blot analysis of the genomic DNA of *Metarhizium anisopliae* showing a *gpdh1* single-copy gene. DNA was digested with BamHI (lane 3), EcoRI (lane 4), PstI (lane 5) and SalI (lane 6), respectively. A 600-bp expressed sequence tag-encoding GAPDH was used as a probe and as the positive control (lane 1). Lambda DNA digested with HindIII was used as a molecular size marker (lane 2). The respective molecular sizes are shown on the left (kb). (b) 2-D gel electrophoresis of protein extracts from *M. anisopliae* cell grown with glucose. (A) Shows SDS-PAGE stained by Coomassie blue and the (B) shows the antibody reactivity against GAPDH heterologous *Paracoccidioides brasiliensis* antiserum (1:2000).

Northern blots probed with the *M. anisopliae gpdh1* cDNA-radiolabeled DNA. The *gpdh1* transcript levels were considerably reduced in the presence of glycerol and ethanol as compared with glucose (Fig. 2a). The cognate protein levels were analyzed by immunodetection using 1- and 2-D gel electrophoresis of protein cell extracts from cultures in the same carbon sources (Fig. 2b–e). Similarly, there was decreased accumulation of GAPDH protein in the presence of glycerol and ethanol as compared with glucose-containing cultures. Both the transcriptional and the protein expression patterns thus showed a direct response to substrate. The *gpdh1* transcripts from *M. anisopliae* cultivated in a medium containing tick exoskeleton and chitin as the sole carbon source were also analyzed (Fig. 3), showing a significant decrease in *gpdh1* transcripts with chitin as compared with both glucose- and exoskeleton-containing cultures.

Localization and activity of GAPDH protein at *M. anisopliae* cell surface

To define the cellular localization of GAPDH in *M. anisopliae* cells, conidia, appressoria, mycelia and blastospores

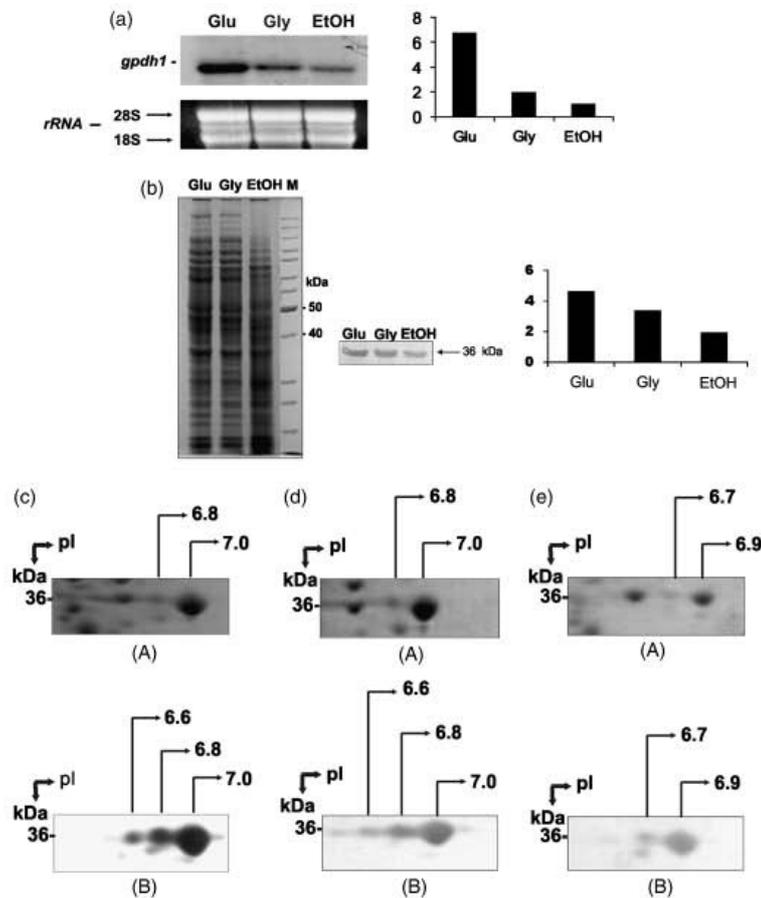


Fig. 2. Analysis of GAPDH protein expression and the cognate transcript under different physiological growth conditions in *Metarhizium anisopliae*. (a) Northern blot analysis of the *gpdh1* transcript from mycelium grown in glucose (Glu), glycerol (Gly) or ethanol (EtOH). The upper panel shows transcript hybridization and the lower panel shows the rRNA ethidium bromide load control. (b) Western blot of protein extracts from the above-mentioned conditions. The left panel shows SDS-PAGE stained by Coomassie blue and the right panel shows the reactivity against GAPDH heterologous *Paracoccidioides brasiliensis* antibody, in which lane Glu represents the glucose condition, lane Gly the glycerol condition, lane EtOH the ethanol condition and lane M is the MW standard. The histogram was established by densitometry analysis using the *IMAGEJ* program. (c) 2-D gel electrophoresis of *M. anisopliae* cell extracts from glucose growth condition, (d) protein extract from glycerol growth condition and (e) protein extract from ethanol growth condition. (A) Shows SDS-PAGE stained by Coomassie blue and (B) shows the antibody reactivity. The total RNA used for Northern blot analysis in liquid medium with 0.6% w/v NaNO₃ amended with 1% chitin or 1% *Rhizopcephalus microplus* exoskeleton was extracted from mycelium grown for 48 h in a liquid medium at 28 °C. Approximately 10 µg of total RNA was loaded onto a 1.2% formaldehyde-containing agarose gel, subjected to electrophoresis and transferred to nylon filters (Amersham Biosciences). Filters were hybridized to radiolabeled [³²P] dNTP probes using a random priming protocol as described by Sambrook & Russel (2001). A cDNA clone coding the *M. anisopliae gpdh1* gene was used as a probe. Normalization of total RNA loaded was carried out using ethidium bromide.

were examined using immunofluorescence microscopy. GAPDH was detected on the cell surface as well as in the cytoplasm (Fig. 4a). The accumulation at blastospore poles was evidenced in 64-h incubation Adamek cultures. Moreover, most of the GAPDH migrated to the poles of germinating blastospores after 3 h of growth in CM medium (Fig. 4b and c).

Fluorescent vesicular-shaped areas could be observed in the cytosol and on the cell surface. Triton X-100 cell washes

substantially decreased the surface protein signals. The presence of GAPDH on the cell surface was also analyzed by measuring the GAPDH catalytic activity of intact conidia in protein extracts from Triton X-100 washes. An increase in GAPDH activity was detected in a 20-min enzyme assay, indirectly indicating the presence of the protein on the cell surface (Fig. 5a). In order to quantify the GAPDH protein on the cell surface, the fluorescence of GAPDH immunolabeled with FITC was measured in intact conidia.

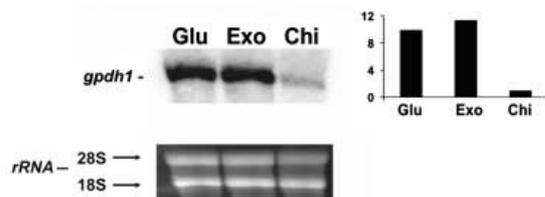


Fig. 3. Analysis of the GAPDH transcript under different growth conditions in *Metarhizium anisopliae*. Northern blot analysis of the GAPDH transcript from mycelium grown with glucose (Glu), tick exoskeleton (Exo) or chitin (Chi). The upper panel shows gene hybridization and the lower panel shows the rRNA ethidium bromide load control. The histogram was established by densitometry analysis using the IMAGE 1 program.

Fluorescence corresponding to 2.4 times more GAPDH protein was detected in disrupted cells as compared with intact cells, indicating a markedly higher internal protein concentration (Fig. 5b).

Recombinant GAPDH and anti-GAPDH serum inhibit *M. anisopliae* conidia adhesion to insect wings

Adhesion assays showed that 71% (2279 ± 246.0) of the WT conidia adhered to *D. peruvianus* fly wings could not be washed off with 0.05% Tween 20. When conidia were treated with anti-GAPDH serum before wing exposure, only 1.3% (30.07 ± 4.959) ($P < 0.0001$) adhered, showing that the antiserum efficiently blocked conidial binding to the wing. To exclude an unspecific effect of the antiserum, we used anti-CHI2 serum as a control. This antiserum binds to a chitinase at the conidial surface (Boldo *et al.*, 2009), and 86.5% (1972 ± 166.7) of the conidia adhered before washing while 106% (1712 ± 177) adhered afterwards. When the wings were treated with the recombinant GAPDH, the adhesion decreased to 31% (697.7 ± 132.4) and 11% (254.3 ± 41.37) ($P < 0.0001$) before and after washing, respectively. Again, to exclude unspecific blocking of the adhesion by the protein wing treatment, we used BSA as a control. In this case, adhesion was 96% (2205 ± 207.8) and 122% (1974 ± 120.4) before and after washing, respectively (Fig. 6).

Discussion

In order to study the possible participation of GAPDH in adhesion to the host, we isolated and characterized the *M. anisopliae* GAPDH gene and protein. The deduced amino acid sequence from the cDNA and from the gene was confirmed by MS identification with the major native protein form (36 kDa, pI 7.0) isolated from 2-D gel electrophoresis of mycelial *M. anisopliae* protein extract. The other two protein isoforms (36 kDa, pIs 6.6 and 6.8) recognized by

immunodetection using the *P. brasiliensis* anti-GAPDH serum led us to infer GAPDH isoform identity. A multiple isoform pattern could suggest different functions for each isoform, as found in other systems (Barbosa *et al.*, 2004; Benndorf *et al.*, 2008).

GAPDH in *M. anisopliae* revealed regulated transcription and translation patterns in response to different carbon sources. In *Mucor circinelloides*, the orthologous *gpdh1* gene was also shown to have a well-defined transcription pattern that is primarily regulated in response to the carbon source by a mechanism that includes a negative regulator (Larsen *et al.*, 2004). The behavior of *gpdh1* gene transcription in *M. anisopliae* in response to different carbon sources led us to infer that glycerol and ethanol are assimilated directly by the citric acid cycle pathway and the oxidative phosphorylation chain. Because of the lack of glucose in these experiments, the *gpdh1* gene transcripts were strongly repressed. The patterns of *gpdh1* transcripts confirm that aerobic metabolism prevails in *M. anisopliae* as would be expected if aerobic metabolism prevails in *M. anisopliae* as well as other filamentous fungi such as *Trichoderma reesei* (Chamberg *et al.*, 2002). A well-known mechanism of carbon-catabolism gene tuning in response to the available substrate is the carbon catabolite repression that was observed in *Aspergillus nidulans*. When this fungus is grown on complex substrates containing both metabolically favorable carbon sources (such as glucose) and less favorable ones (such as ethanol and glycerol), it is able to repress the genes involved in the utilization of the less favorable carbon. An important regulatory protein controlling carbon repression in *A. nidulans* is CreA (Mogensen *et al.*, 2006). In *M. anisopliae*, repression occurs by CRRI (Screen *et al.*, 1997), the CreA ortholog.

A marked decrease in *gpdh1* transcript accumulation in total RNA extracted from *M. anisopliae* grown in chitin-containing media was seen in Northern blot analysis compared with that grown in exoskeleton- and glucose-containing media as the sole carbon source. The absence of metabolically favorable carbon sources in the chitin-containing media could trigger the negative regulation of the *gpdh1* gene to the detriment of the positive regulation of genes encoding the enzymes required for the use of metabolically less favorable carbon sources. The complexity of the exoskeleton that was added to the culture medium is difficult to determine. This could explain the positive regulation of the GAPDH gene in the exoskeleton-containing media, in addition to the possible host-adhesion role of GAPDH (Dutra *et al.*, 2004; Mogensen *et al.*, 2006).

Immunofluorescence microscopy was performed to elucidate the subcellular protein localization. Conidia, appressoria, mycelia, blastospores and germinated blastospores were analyzed and both cytosolic and surface forms of the GAPDH protein were observed in vesicular-like structures,

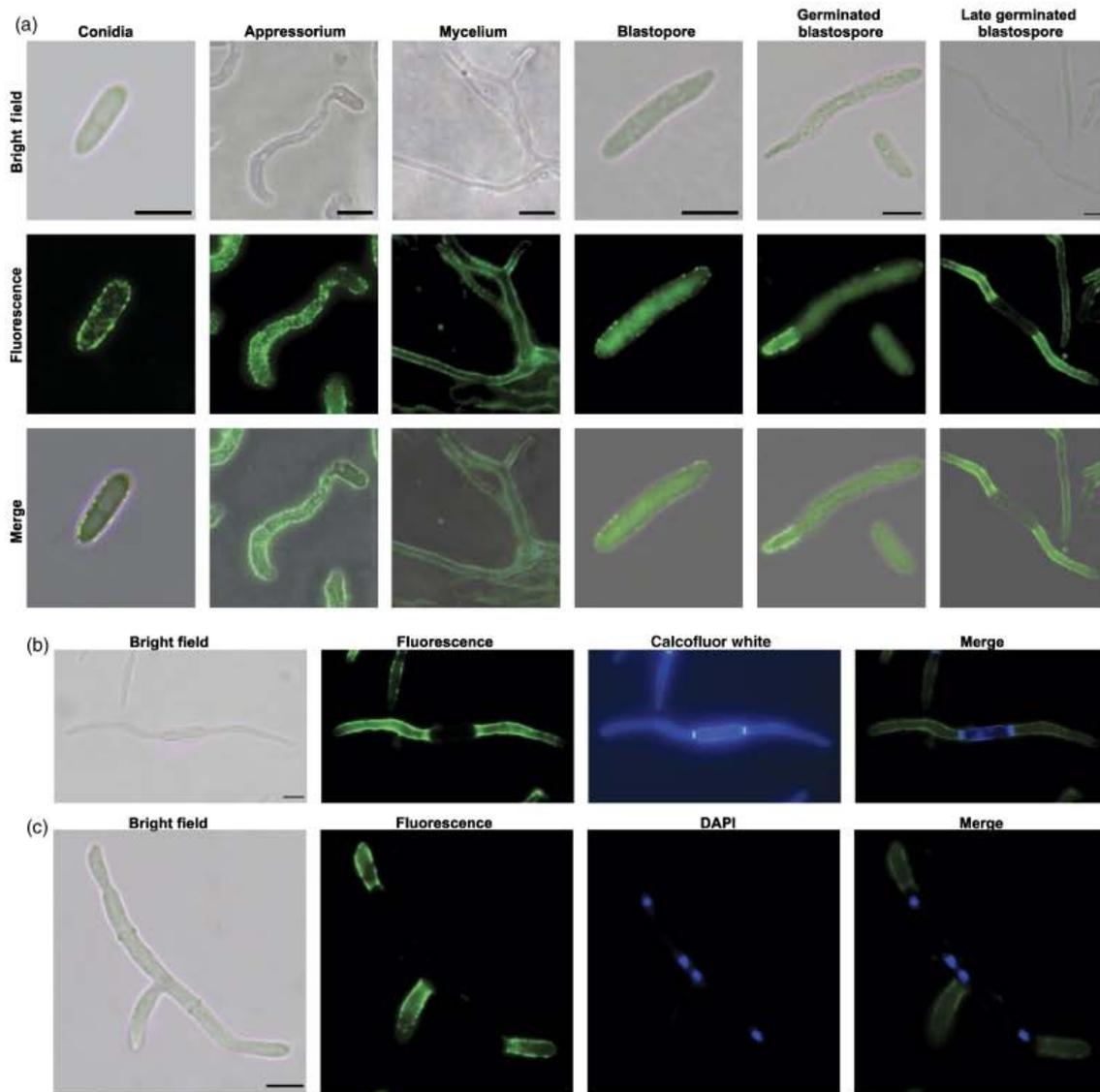


Fig. 4. Indirect immunofluorescence microscopy of *Metarhizium anisopliae* cell types after anti-GAPDH immune-FITC labeling. (a) *Metarhizium anisopliae* cell types, bright field, fluorescence and merged images. (b) Germinated blastospores, bright field, fluorescence, calcofluor white (CFW)-stained and merged images. (c) Germinated blastospore, bright field, fluorescence, DAPI-stained and merged images. Scale bar = 5 μm .

as reported before (Rodrigues *et al.*, 2007, 2008; De Jesus *et al.*, 2009). Cell-surface GAPDH localization was corroborated by Triton X-100 surface removal of the protein and the measurement of specific GAPDH activity. Surface GAPDH was also quantified by fluorescence using a polyclonal antibody. Both methods corroborated the presence of GAPDH on the cell surface. This 'unexpected' localization of cytosolic enzymes is increasingly being recognized in both eukaryotic and prokaryotic cells (Barbosa *et al.*, 2006; Egea

et al., 2007). The presence of GAPDH on the external cell surface of *M. anisopliae* raises some questions, such as how incorporation into the cell wall occurs in the absence of a conventional N-terminal signal sequence that is responsible for targeting the protein in the secretory pathway. The vesicular-like structures presented by GAPDH would lead us to hypothesize that there is a vesicle-secretion pathway across the cell wall (Rodrigues *et al.*, 2007); however, more studies will be needed to verify this possibility.

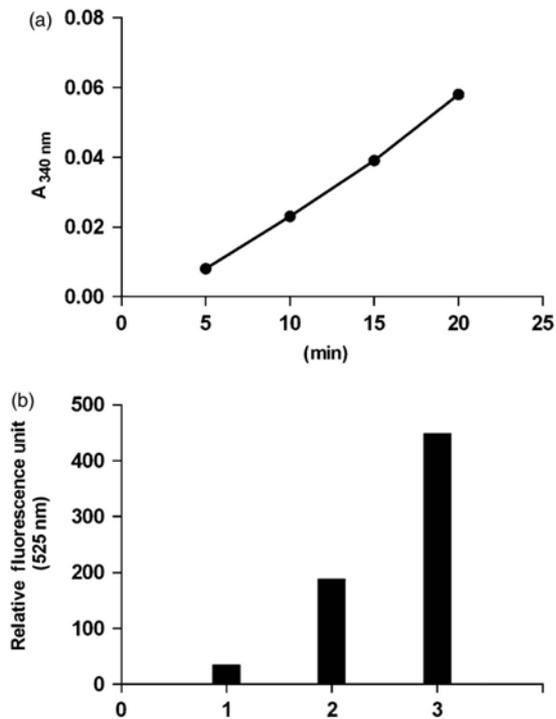


Fig. 5. GAPDH detection in *Metarhizium anisopliae* conidia. (a) GAPDH surface activity determined from conidial surface protein extract over 20 min at 25 °C. (b) Relative fluorescence from conidia immunolabeled with FITC-conjugated GAPDH antiserum. 1, Control made with conidia with no FITC label; 2, FITC-labeled conidia; and 3, lysed FITC-labeled conidia.

The blastospore pole migration pattern evidenced after a 64-h cultivation and the almost complete GAPDH migration to the poles of germinated blastospore are remarkable events in GAPDH localization in *M. anisopliae* cells. One simple explanation for this recruitment is the increased metabolic activity in these regions of the germinating cells. On the other hand, the surface localization at the blastospore pole could have another function: inhibition of the host immune system through a molecular mimicry mechanism, because the fungal and host GAPDH share high identity, leading to a lack of recognition of the pathogen by the host immune system (Goudot-Crozel *et al.*, 1989; Terao *et al.*, 2006).

The possible involvement of *M. anisopliae* GAPDH in the host-infection process can be suggested by its surface localization in conidial cells, the increased level of transcripts in the presence of exoskeleton and especially by the inhibition of *M. anisopliae* conidial adhesion to *D. peruvianus* fly wings caused by incubation with recombinant GAPDH and with anti-GAPDH polyclonal antibody. One of the possible roles of GAPDH in infection could be as an adhesin during the initial contact between the conidia and

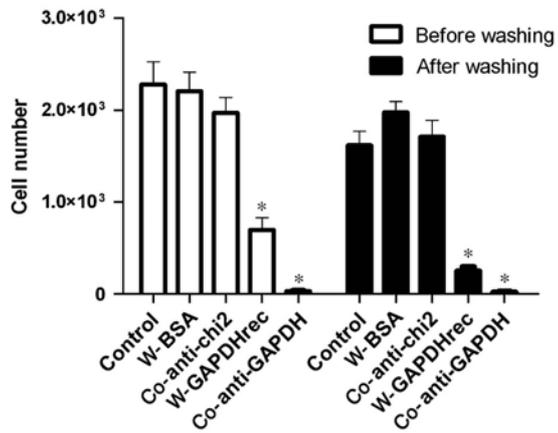


Fig. 6. Adherence assay. Binding of conidia cells to *Dysdercus peruvianus* fly wings. Bar graph quantifying the number of *Metarhizium anisopliae* conidia adhered to insect fly wings. As adherence control, WT conidia and insect wings undergo no incubation (before and after washes). W-BSA, wings incubated with BSA; W-GAPDHrec, wings incubated with recombinant GAPDH; Co-anti-chi2, conidia incubated with anti-chi2; Co-anti-GAPDH, conidia incubated with anti-GAPDH. Values represent means ± SE. Empty bar, before wash; black bar, after wash. *Values statistically different from the control (*P* value of < 0.0001).

the host cuticle, as occurs in other pathogenic fungi and their hosts, or adhesion during close contact with tissue or host defense cells (Alderete *et al.*, 2001).

Recent studies have demonstrated the involvement of GAPDH proteins from different pathogens in host adhesion and invasion (Barbosa *et al.*, 2006; Terao *et al.*, 2006; Egea *et al.*, 2007; Hoelzle *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007, 2008a, b; Kinoshita *et al.*, 2008; Lama *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2009). The regulation of transcripts and enzyme production has been shown to be modulated under several physiological conditions during fungal growth. The data presented here comprise the first evidence of a possible involvement of *M. anisopliae* GAPDH in the infection process and in the carbon source-regulated transcription response of the *M. anisopliae gpdh1* gene. We also detected the GAPDH protein in the conidial cell wall with some possible implications for the host interaction process, possibly with adhesion activity as reported for other pathogens. Future studies investigating the possible roles of GAPDH protein from *M. anisopliae* in the host infection process will add information to understand this complex process.

Acknowledgements

This work was supported by grants and fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and CAPES. We are very grateful to

Dr Irene Schrank and Dr Antonio F.M. Pinto for critically reading the manuscript and for their valuable comments. We are grateful for the PIGS-DNA-sequencing and the UNIPROT-MS facilities.

References

- Adamek L (1963) Submersed cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.). *Folia Microbiol* **10**: 255–257.
- Alderete JF, Millsap KW, Lehker MW & Benchimol M (2001) Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. *Cell Microbiol* **3**: 359–370.
- Barbosa MS, Cunha Passos DA, Felipe MS, Jesuino RS, Pereira M & de Almeida Soares CM (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.
- Barbosa MS, Bao SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, dos Santos Feitosa L, Mendes-Giannini MJ & Soares CM (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.
- Benndorf D, Müller A, Bock K, Manuwald O, Herbarth O & von Bergen M (2008) Identification of spore allergens from the indoor mould *Aspergillus versicolor*. *Allergy* **63**: 454–460.
- Bischoff JF, Rehner SA & Humber RA (2009) A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* **101**: 512–530.
- Bogo MR, Rota CA, Pinto H Jr, Ocampos M, Correa CT, Vainstein MH & Schrank A (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.
- Boldo JT, Junges A, do Amaral KB, Staats CC, Vainstein MH & Schrank A (2009) Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Curr Genet* **55**: 551–560.
- Bryksin AV & Laktionov PP (2008) Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in vesicular transport from golgi apparatus to endoplasmic reticulum. *Biochemistry* **73**: 619–625.
- Chamberg FS, Bonaccorsi ED, Ferreira AJ, Ramos AS, Ferreira Junior JR, Abrahao-Neto J, Farah JP & El-Dorri H (2002) 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.
- Crowe JD, Sievwright IK, Auld GC, Moore NR, Gow NA & Booth NA (2003) *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Mol Microbiol* **47**: 1637–1651.
- De Jesus M, Nicola AM, Rodrigues ML, Janbon G & Casadevall A (2009) Capsular localization of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide component galactoxylo-mannan. *Eukaryot Cell* **8**: 96–103.
- Dutra V, Nakazato L, Broetto L, Silveira Schrank I, Henning Vainstein M & Schrank A (2004) 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.
- Egea L, Aguilera L, Gimenez R, Sorolla MA, Aguilar J, Badia J & Baldoma L (2007) Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. *Int J Biochem Cell B* **39**: 1190–1203.
- Goudot-Crozel V, Caillol D, Djabali M & Dessein AJ (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.
- Hoelzle LE, Hoelzle K, Helbling M, Aupperle H, Schoon HA, Ritzmann M, Heinritz K, Felder KM & Wittenbrink MM (2007) MSG1, a surface-localized protein of *Mycoplasma suis* is involved in the adhesion to erythrocytes. *Microbes Infect* **9**: 466–474.
- Jungehulsing U, Arntz C, Smit R & Tudzynski P (1994) 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 JW & Dang CV (2005) Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci* **30**: 142–150.
- Kinoshita H, Wakahara N, Watanabe M *et al.* (2008) Cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) of *Lactobacillus plantarum* LA 318 recognizes human A and B blood group antigens. *Res Microbiol* **159**: 685–691.
- Lama A, Kucknoor A, Mundodi V & Alderete JF (2009) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* **77**: 2703–2711.
- Larsen GG, Appel KE, Wolff AM, Nielsen J & Arnau J (2004) Characterisation of the *Mucor circinelloides* regulated promoter *gpd1P*. *Curr Genet* **45**: 225–234.
- Lu GT, Xie JR, Chen L *et al.* (2009) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is required for extracellular polysaccharide production and full virulence. *Microbiology* **155**: 1602–1612.
- Mogensen J, Nielsen HB, Hofmann G & Nielsen J (2006) 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.
- Ridder R & Osiewacz HD (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.
- Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, Frases S, Miranda K, Zaragoza O, Alvarez M, Nakouzi A, Feldmesser M & Casadevall A (2007) Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot Cell* **6**: 48–59.
- Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD, Almeida IC & Casadevall A (2008) Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* **7**: 58–67.
- Sambrook J & Russel D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schrank A & Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.03.008.
- Screen S, Bailey A, Charnley K, Cooper R & Clarkson J (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.
- Silva WOB, Santi L, Berger M, Pinto AFM, Guimarães JA, Schrank A & Vainstein MH (2009) Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochem* **44**: 829–834.
- Sirover MA (2005) New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J Cell Biochem* **95**: 45–52.
- Templeton MD, Rikkerink EH, Solon SL & Crowhurst RN (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.
- Terao Y, Yamaguchi M, Hamada S & Kawabata S (2006) Multifunctional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pyogenes* is essential for evasion from neutrophils. *J Biol Chem* **281**: 14215–14223.
- Zhang A, Xie C, Chen H & Jin M (2008a) Identification of immunogenic cell wall-associated proteins of *Streptococcus suis* serotype 2. *Proteomics* **8**: 3506–3515.
- Zhang C, Yu L & Qian R (2007) Characterization of OmpK, GAPDH and their fusion OmpK-GAPDH derived from *Vibrio harveyi* outer membrane proteins: their immunoprotective ability against vibriosis in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *J Appl Microbiol* **103**: 1587–1599.
- Zhang C, Yu L & Qian R (2008b) Cloning and expression of *Vibrio harveyi* OmpK* and GAPDH* genes and their potential application as vaccines in large yellow croakers *Pseudosciaena crocea*. *J Aquat Anim Health* **20**: 1–11.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article:

Appendix S1. Heterologous expression of GAPDH.

Appendix S2. Standard DNA manipulations, screening of cDNA library, gene cloning and sequencing.

Fig. S1. Sequence and schematic diagram of the *gpdh1* gene from *Metarhizium anisopliae*.

Fig. S2. Phylogenetic tree of *gpdh1* proteins.

Table S1. Identity and similarity (conservative substitutions) values from sequence alignment of the predicted amino acid sequence from *Metarhizium anisopliae* GAPDH with orthologs from several related fungi species and *Escherichia coli* (as outgroup sequence).

Table S2. Amino acids sequence of internal peptides from a protein with molecular mass of 36 kDa and pI 7.0, with a high protein score to *Metarhizium anisopliae* GAPDH (ABK40074, accession number of the correspondent protein in NCBI database) isolated from 2-D gel electrophoresis of *M. anisopliae* mycelial protein extracts.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Supporting information 1

Heterologous expression of GAPDH

Escherichia coli BL21 pLysS strain hosting the plasmid construct pET-32b (+)::GAPDH (*M. anisopliae* GAPDH gene harboring vector) was cultured in LB medium ampicilin added (100 µg/mL) at 37 °C until 1 O. D. Expression was induced by IPTG (1 mM at final concentration) and after 3 h induction, cells were pelleted by centrifugation and resuspended in resin purification wash buffer. (50 mM NaH PO / 300 mM NaCl/ 20 mM imidazol). Cells were lysed by in lysozyme (1 mg/mL) for 30 min incubation and sonicated six 10 s bursts at 200–300 W with a 10 s cooling period between each burst on ice using a ultra-sound equipped with a microtip. After cell lysis, cellular debris were separated by centrifugation and the supernatant was saved and filtered in 0.45 µM filter. The recombinant protein was purified by affinity chromatography in Ni-NTA matrix (QIAGEN). After protein extract resin adsorption, resin was washed with wash buffer and elution fraction were obtained by washes with elution buffer (50 mM NaH PO / 300 mM NaCl / 250 mM imidazol). The purified fraction was assessed by SDS-PAGE.

Supporting information 2

Standard DNA manipulations, screening of cDNA library, gene cloning and sequencing

In all DNA hybridization experiments, a previously isolated EST coding for GAPDH was used as a probe (Dutra et al. 2004). The cDNA library, constructed using the SuperScript Lambda System for cDNA Synthesis and Cloning (GIBCO BRL) from poly(A+) RNA isolated from *M. anisopliae* grown on medium supplemented with 1% *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cuticle (Dutra et al. 2004), was screened using 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 the Staden package program (Bonfield et al. 1995).

Sequence alignment and phylogenetic analysis

The predicted amino acid sequence from *M. anisopliae* GAPDH was aligned with orthologs from several related fungal species using ClustalX 1.83 (Thompson et al. 1997). The phylogenetic trees were constructed using Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 4) software (Tamura et al. 2007) and the neighbor-joining method with Poisson correction, and the confidence was evaluated using 10,000 bootstrap replications.

A

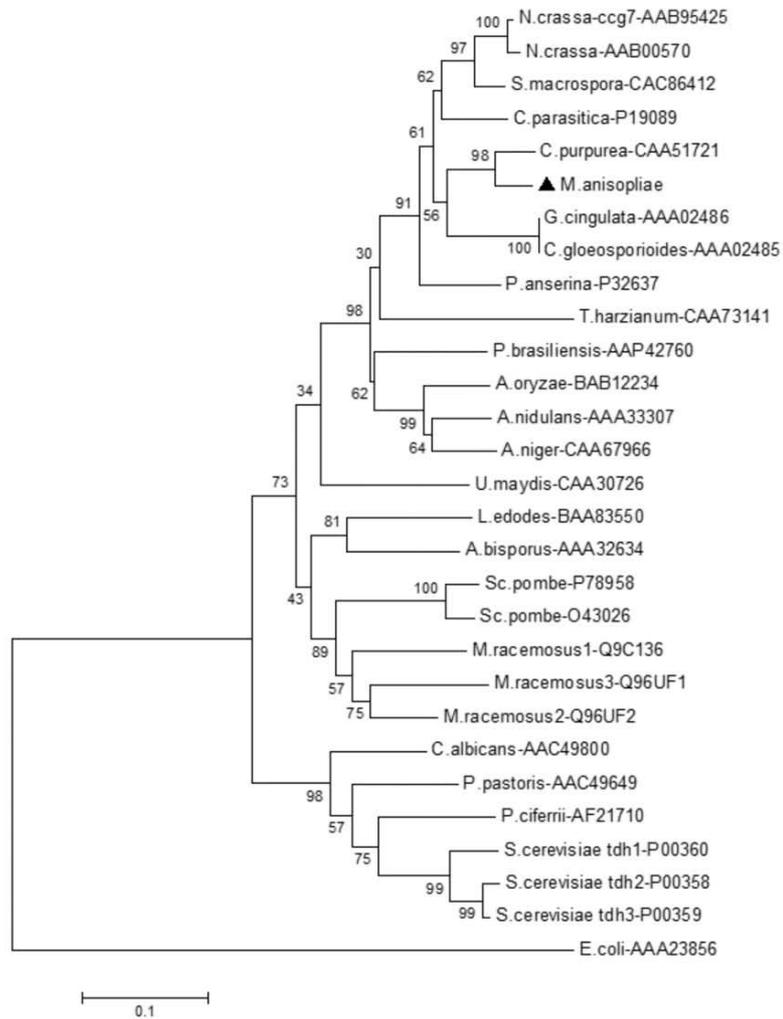
```

1  gaggatcccccttgcgctctctccatatacacacacgcaaaATGgctcccccaaggctggcatcaaggtttcgccct 80
81  IGRIVFRNAAEHPFEIEVVAVNDPFIDT
161  EYA
161  TGAAACGCgtgagtgctcccttgcctcttttttgcgctcgtgtccgagtgaggctgttggcttgcctccctccctcc 240
241  tcccttgggttgggtccattcactgcccctcgttgaactctgaggtccatgccaccacaactccagctggagc 320
321  AYLHLY
321  cccacgcaagctttacccttgcgaatgcccgggttgcgactggaacccgtttgccatgaccagcctACAGCTCAAGTA 400
401  DSSHGIFRQDIEKKEADGLVNVHKKVK
481  FTIERDPSAIFWKSAAGAEYIIVESTGVF
561  TTTDKAFAHLAAGGAKKVVVISAPSDAP
561  ACCACCACACAGGCCAAGGCCATCTGGCCGAGGCCCAAGAGGCTCATCTCTCTCCCTCTGCCGATGCCCC 640
641  MYVMGVNEKTYDGKADVVISNAS○TTN
641  CATGTACGTATGGGTCAACGAGAAGACTACGACGCAAGGCCATGTCTCCCAACGCTTCTGCACCACCAACT 720
721  CLAPLAKVVIHDKFTIVEGLMTTV○SYT
721  GCCTGGCTCCCTTGCACAGGTCTCCACGACAGTTCACATTGTGAGGGTCTCATGACCACCGTCCACTCTACACC 800
801  ATQKTVVDGSPSGKDWRRGGRGAAQNIIPS
881  STGAAKAVGKVIIPDLNGKLTGMSMRV
881  CAGCACCGTGGCCCAAGGCTGTCCGCAAGTTCATCCCGAAGCTCAACGCAAGCTCACTGGCATGTCCATGCGTTC 960
961  PTANVSVVVDLTAIEKGSYDEIKEAI
961  CCACCACCAAGTCTCCGTTGTGACTTGAATGCCCATGAGAAGGCTCTCTACGACGAGATCAAGGAGGCATC 1040
1041  KEAANGPLKGLAYTEDDVVSDDMNGN
1041  AAGAGGCTGCCAAGGCCCTCAAGGCCATCTCCGCTACACGAGGACGATGTGTCTCTCCGACATGAACGGCAA 1120
1121  TNSSEIFDAKAGCISLNNKNEVKKLVSWYD
1121  CACCAACTCTCCATCTTTCAGCCAGGCCGATCTCCCTCAACGAAGACTTGTCAAGTGGTCTCTCGTACGACA 1200
1201  NENGYSSRRVLDLLEYIAKVDAGK
1201  ACGAGTGGGCTACTCCCGCGTCTCCGATCTCTTGCCTACATGCCAAGGTGACGCTGGCAAGTA●atttggct 1280
1281  ttgattgctacgacaggaacgactgctcaatctcctgcatcggtaagtgtgctctggaactccatggtactttggct 1360
1361  gcggtccccgagatggcctcaaggatTTTTTTTaaagaaataagagagtaaccgaaatggaacaaatcgagttt 1440
1441  aaactggcagctgggactcaaatgttggtaataaagaaataatctctggacatggtcccggtggagggag 1520
1521  gggtaacatacaactactgagaatgagctgttctgtccaaaaaaa 1574

```



Supporting Figure S1. 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 letters and all other sequences are in lower-case letters. The intron is indicated. Start and stop codons are underlined and in bold. 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 cysteine residue (Cys151), which reacts with the aldehyde substrate at the NAD⁺ binding domain, and the histidine residue (His178), which acts in deprotonation of the hemithioacetal in the catalytic domain. **(B)** Schematic diagram of protein domains: the grey box represents the NAD⁺ binding domain (Gp_dh_N) and the white box the catalytic domain (Gp_dh_C).



Supporting Figure S2. Phylogenetic tree of *gpdh1* proteins.

M. anisopliae gpdh1 gene deduced amino acid sequence neighbor-joining tree showing its phylogenetic placement with related orthologous fungal proteins (GenBank accession numbers are beside the species' names). Confidence was confirmed by 10,000 bootstraps. Bar, substitutions per nucleotide position. *M. anisopliae* sequence is highlighted by a black triangle.

Supporting Table SI. 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 cifferri</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%

Supporting Table S2. Amino acids sequence of internal peptides from a protein with molecular mass of 36 kDa and pI 7.0, with a high protein score to *Metarhizium anisopliae* GAPDH (ABK40074, accession number of the correspondent protein in NCBI database) isolated from two-dimensional gel electrophoresis of *M. anisopliae* mycelial protein extracts.

Peptide sequence	Observed ^a	Mr (expt) ^b	Mr (calc) ^c	Delta ^d	Miss ^e	Score ^f	Expect ^g	Rank ^h
GILAYTEDDVVSSDMNGNTNSSIFDAK	1440.1415	2878.2684	2878.2815	-0.0130	0	128	1.6e-10	1
FTIIVEGLMTTVHSYTATQK	715.0166	2142.0280	2142.0667	-0.0388	0	(42)	0.21	1
VVISAPSADAPMYVMGVNEK	1055.4679	2108.9212	2109.0122	-0.0910	0	(93)	9e-07	1
SAGAEYIVESTGVFTTIDK	988.4499	1974.8852	1974.9422	-0.0570	0	127	5.5e-10	1
LVSWYDNEWGYSR	837.8727	1673.7308	1673.7474	-0.0166	0	(67)	0.00053	1
VPTANVSVDLTAR	721.4022	1440.7898	1440.7937	-0.0038	0	(115)	1.6e-08	1
GASYDEIKEAIK	662.3236	1322.6326	1322.6718	-0.0391	1	103	3.3e-07	1
VLDLLAYIAK	559.8319	1117.6492	1117.6747	-0.0254	0	68	0.00092	1

^a Experimental m/z value.

^b Experimental m/z transformed to a relative molecular mass.

^c Calculated relative molecular mass of the matched peptide.

^d Difference (error) between the experimental and calculated masses.

^e Number of missed enzyme cleavage sites.

^f Ions score - If there are duplicate matches to the same peptide, then the lower scoring matches are shown in brackets.

^g Expectation value for the peptide match.

^h Rank of the ions match, (1 to 10, where 1 is the best match).

ANEXO 2

Leonardo Broetto

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Leonardo Broetto
Filiação Roberto Broetto e Maria Isabel Sgiers Broetto
Nascimento 25/10/1979 - Porto Alegre/RS - Brasil
Carteira de Identidade 1070529597 SSP - RS - 29/11/1993
CPF 00388813067

Formação Acadêmica/Titulação

- 2006** Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Caracterização da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do fungo *Metarhizium anisopliae*, Ano de obtenção: 2010
Orientador: Augusto Schrank
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2005 - 2006** Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Isolamento e caracterização do gene que codifica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do fungo *Metarhizium anisopliae*, Ano de obtenção: 2006
Orientador: Augusto Schrank
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2000 - 2004** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Isolamento e caracterização parcial do gene que codifica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do fungo *Metarhizium anisopliae*
Orientador: Augusto Schrank
Bolsista do(a): Pró Reitoria de Pesquisa

Formação complementar

- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Curso Introdução à genômica funcional.
Instituto de Biologia Molecular do Paraná, IBMP, Curitiba, Brasil

Prêmios e títulos

- 2003** Premiação e destaque por desempenho científico-acadêmico, UFRGS-XV Salão e XII Feira de Iniciação Científica

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Paula D A J, Filho J X O, Silva M C, Colodel E M, Broetto, Leonardo, PINTO, Paulo Marcos, SCHRANK, Augusto, NAKAZATO, Luciano, DUTRA, Valéria
Molecular characterization of ovine zygomycosis in central western Brazil.. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* , v.22, p.274 - 277, 2010.
2. BUSSAMARA, Roberta, FUENTEFRIA, Alexandre Meneghello, Oliveira, Eder Silva de, Broetto, Leonardo, Simcikova, Michaela, VALENTE, Patrícia, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning
Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresource Technology.* , p.xxx - xxx, 2009.
3. STAATS, Charley Christian, Boldo, Juliano, Broetto, Leonardo, Vainstein, Marilene, SCHRANK, Augusto
Comparative genome analysis of proteases, oligopeptide uptake and secretion systems in *Mycoplasma* spp. *Genetics and Molecular Biology (Impresso).* , v.30, p.225 - 229, 2007.
4. NAKAZATO, Luciano, DUTRA, Valéria, BROETTO, Leonardo, STAATS, Charley Christian, VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto
Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef-1alpha* homologous promoter.. *Applied Microbiology and Biotechnology.* , v.72, p.521 - 528, 2006.
5. BROETTO, Leonardo, CECAGNO, Ricardo, SANT´ANNA, Fernando H, WEBER, Shanna, SCHRANK, Irene S
Stable transformation of *Chromobacterium violaceum* with a broad-host-range plasmid. *Applied Microbiology and Biotechnology.* , v.71, p.450 - 454, 2005.
6. DUTRA, Valéria, NAKAZATO, Luciano, BROETTO, Leonardo, SCHRANK, Irene Silveira, VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto
Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticule.. *Research in Microbiology (Paris).* , v.155, p.245 - 251, 2004.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. LANDELL, Melissa Fontes, BROETTO, Leonardo, VAINSTEIN, Marilene Henning, VALENTE, Patrícia
Bioprospecção de leveduras isoladas de bromélias produtoras de enzimas com potencial aplicação biotecnológica. In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas-PE.
Bioprospecção de leveduras isoladas de bromélias produtoras de enzimas com potencial aplicação biotecnológica.. , 2009.
2. BROETTO, Leonardo, LANDELL, Melissa Fontes, Beringer, J., Kunzler, B., JUNGES, Angela, BOLDO, Juliano T, VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto
Caracterização da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do fungo *Metarhizium anisopliae*. In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas-PE.
25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. , 2009.
3. LANDELL, Melissa Fontes, BROETTO, Leonardo, RAMOS, J., LEONCINI, O., VAINSTEIN, Marilene Henning, VALENTE, Patrícia
TAXONOMIA MOLECULAR DE LEVEDURAS ISOLADAS DE BROMÉLIAS EM UMA REGIÃO DE MATA ATLÂNTICA DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL. In: 25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2009, Porto de Galinhas-PE..
25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. , 2009.
4. Beringer, J., BROETTO, Leonardo, SCHRANK, Augusto
Análise e identificação de proteínas secretadas pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium*

anisopliae In: XX Salão de Iniciação Científica, 2008, Porto Alegre.

XX Salão de Iniciação Científica. , 2008.

5. TRENTINI, Debóra, CECAGNO, Ricardo, BROETTO, Leonardo, SCHRANK, Irene Silveira Isolamento de mutantes de *Chromobacterium violaceum* utilizando mutagênese aleatória por transposons. In: 25ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2006, São Pedro, SP.

25ª Reunião de Genética de Microrganismos. São Pedro: Copiadora Luís de Queiroz, 2006. v.25. p.214 - 214

6. PALMA, Lenise P, STAATS, Charley C, JUNGES, Angela, BOLDO, Juliano T, BROETTO, Leonardo, SOUZA, Tatiana S F, SILVEIRA, Carolina P, VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto

Análise do padrão de expressão dos genes *chit1*, *chit2* e *chit3* em condições vegetativas e de infecção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos/SP.

Programa e Resumos. , 2005. v.23. p.264 - 264

7. BOLDO, Juliano T, JUNGES, Angela, STAATS, Charley C, PALMA, Lenise P, BROETTO, Leonardo, NAKAZATO, Luciano, BARATTO, César Milton, VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto

Construção de uma linhagem de *Metarhizium anisopliae* superexpressando a quitinase codificada pelo gene *chi2* In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos / SP.

Programa e Resumos. , 2005. v.23. p.264 - 264

8. BROETTO, Leonardo, VAINSTEIN, Marilene H, SCHRANK, Augusto

Isolamento e caracterização do gene que codifica para enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do fungo *Metarhizium anisopliae* In: VII Reunião do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2005, Porto Alegre.

Livro de Resumos. , 2005. p.13 - 13

9. BROETTO, Leonardo, DUTRA, Valéria, NAKAZATO, Luciano, PALMA, Lenise P, BOLDO, Juliano T, VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto

Isolamento e caracterização do gene que codifica para enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do fungo *Metarhizium anisopliae* In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos/SP.

Programa e Resumos. , 2005. v.23. p.246 - 246

10. BUSSAMARA, Roberta, FUENTEFRIA, Alexandre, BROETTO, Leonardo, VALENTE, Patrícia, VAINSTEIN, Marilene Henning

Produção e imobilização da lipase de *Pseudozyma hubeiensis* para utilização como catalisador na produção de biodiesel In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos / São Paulo.

Programa e Resumos. São Paulo: POLO, 2005. v.23. p.248 - 248

11. DUTRA, Valéria, NAKAZATO, Luciano, BROETTO, Leonardo, PINTO, Paulo Marcos, VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto

Aplicação de RDA na identificação de ESTs expressas por *Metarhizium anisopliae* durante o processo de infecção no carrapato *Boophilus microplus*. In: XXIV Reunião de genética de microrganismos, 2004, Gramado - RS.

Programa de Resumos. , 2004. p.129 - 129

12. NAKAZATO, Luciano, DUTRA, Valéria, BROETTO, Leonardo, PINTO, Paulo Marcos, VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto

Construção de vetores de expressão para *Metarhizium anisopliae* baseados no promotor do gene *tef1*-alfa homólogo. In: XXIV Reunião de genética de microrganismos, 2004, Gramado - RS.

Programa de Resumos. , 2004. p.130 - 130

13. BROETTO, Leonardo, DUTRA, Valéria, NAKAZATO, Luciano, VAINSTEIN, Marilene

Henning, SCHRANK, Augusto

Isolamento e caracterização parcial do gene que codifica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do fungo *Metarhizium anisopliae*. In: XXIV Reunião de genética de microrganismos, 2004, Gramado - RS.

Programa de Resumos. , 2004. p.156 - 156

14. KOGLER, Viviane, BROETTO, Leonardo, VAINSTEIN, Marilene Henning

Isolamento, seleção e caracterização de microrganismos produtores de lipases em curtumes. In: XXIV Reunião de genética de microrganismos, 2004, Gramado - RS.

Programa de Resumos. , 2004. p.80 - 80

15. BROETTO, Leonardo, VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto

Isolamento e caracterização parcial do gene que codifica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do fungo *Metarhizium anisopliae* In: XV Salão e XII Feira de Iniciação Científica, 2003, Porto Alegre.

CD-Rom. , 2003. p.392 - 392

16. NAKAZATO, Luciano, BROETTO, Leonardo, VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto

Construção de vetores de expressão para o fungo *Metarhizium anisopliae* baseados no promotor homólogo do gene *tef-1* alfa In: XIII Reunião de Genética de Microrganismos, 2002, Pirenópolis - GO.

Programa de Resumos. , 2002. p.78 - 78

17. BROETTO, Leonardo, NAKAZATO, Luciano, VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto

Isolamento e caracterização parcial do gene *tef-1* alfa de *Metarhizium anisopliae* In: XIV Salão XI Feira de Iniciação Científica PROPESQ/UFRGS, 2002, Porto Alegre.

CD-rom. , 2002. p.474 - 474

18. BROETTO, Leonardo, DUTRA, Valéria, VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto

Otimização da Técnica de extração de RNA do fungo *Metarhizium anisopliae* para estudo da expressão gênica em diferentes condições de cultivo In: XII Salão e X Feira de Iniciação Científica - PROPESQ/UFRGS, 2002, Porto Alegre.

CD-rom. , 2002. p.326 - 326

Produção Técnica

Demais produções técnicas

1. BROETTO, Leonardo, Zaha, Arnaldo

Curso de treinamento em Sequenciamento e Análise de Genomas II, 2004. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

ANEXO 3

A1.1. Soluções e meios de cultivo

A1.1.1. Meio de Cove completo – MCc (COVE 1966)

Nitrato de Sódio (NaNO_3) - 0,6 % (m/V)

Glicose - 1 % (m/V)

Peptona - 0,2 % (m/V)

Extrato de Levedura - 0,05 % (m/V)

Caseína Hidrolisada - 0,15 % (m/V)

Solubilizado em água destilada e pH ajustado para 6.0. Esterilização utilizando autoclave com adição de 2% de Solução de Sais (item 3.1.1.2) e 0,04% de Solução de Elementos Traços (item 3.1.1.3) no momento do uso.

A1.1.2. Solução de Sais

Cloreto de Potássio (KCl) - 2,6 % (m/V)

Sulfato de Magnésio heptaidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) - 2,6 % (m/V)

Fosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4) - 7,6 % (m/V)

Solubilizados em água destilada e esterilizada por autoclavagem.

A1.1.3. Solução de Elementos Traços

Borato de Sódio heptaidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) - 0,004% (m/V)

Sulfato de Cobre pentaidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) - 0,04% (m/V)

Sulfato de Ferro (FeSO_4) - 0,0001% (m/V)

Sulfato de Manganês diidratado (MnSO_4) - 0,08 % (m/V)

Molibdato de Sódio diidratado ($\text{Na}_2\text{Mo}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - 0,08 % (m/V)

Sulfato de Zinco heptaidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) - 0,08 % (m/V)

Adição de HCl concentrado até a completa solubilização dos sais.

Esterilização por autoclavagem.

A1.1.4. Solução de Tween-80 0,01 % (V/V)

Tween-80 - 0,01 % (V/V)

Solubilizado em água destilada e esterilizado por autoclavagem.

A.1.1.5. Meio de Luria-Bertani – LB

Triptona - 1 % (m/V)

Extrato de Levedura - 0,5 % (m/V)

Cloreto de Sódio (NaCl) - 1 % (m/V)

Solubilizado em água destilada pH ajustado para 7.0. Esterilização por autoclavagem.

A.1.6. Solução de Glicerol 10 % (V/V)

Glicerol - 10 % (V/V)

Solubilizado em água destilada. Esterilização por autoclavagem.

A.1.7. Tampão Tris-EDTA – TE

Tris.Cl pH 8.0 - 10 mM

EDTA - 1 mM

Solubilização em água Milli-Q e esterilização por autoclavagem.

A.1.1.15. Solução de Pré-hibridização

SSC (item 3.1.1.13) - 5 x

Reagente de Denhardt (item 3.1.1.14) - 5 x

SDS - 0,1 % (m/V)

Solubilização em água destilada no momento do uso.

A1.1.16. Solução de SSC 20 x

Cloreto de Sódio (NaCl) - 3 M

Citrato de Sódio ($\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$) - 0,3 M

Solubilizado em água destilada, pH ajustado para 7 com HCl e esterilização por autoclavagem.

A.1.1.17. Reagente de Denhardt 50 x

FICOLL 400 - 1 % (m/V)

Polivinilpirrolidona - 1 % (m/V)

Albumina Sérica Bovina (Fração V) - 1 % (m/V)

Solubilizado em água destilada, filtrado por filtros de poros de 0,45 μm e armazenado a -20 °C.

A.1.1.18. Solução de glicose 1% (m/V)

Glicose - 1 % (m/V)

Esterilização por passagem em filtros de 0,22 μm . Armazenar em temperatura ambiente.

A.1.1.19. Solução de IPTG 0,8 M

IPTG - 20 % (m/V)

Solubilizado em água destilada e esterilização por filtração em filtros de 0,22 µm. Armazenado a -20 °C.

A.1.1.20. Meio Mínimo – MM

Nitrato de Sódio (NaNO₃) - 0,6 % (m/V)

Fonte de carbono (glicose, quitinase cristalina ou GlcNAc)

Adicionar os reagentes em água destilada e esterilização por autoclavagem.

A.1.1.21. Tampão PBS 10 X

Cloreto de Sódio (NaCl) - 8 % (m/V)

Cloreto de Potássio (KCl) - 0,2 % (m/V)

Fosfato de Sódio (Na₂HPO₄·2H₂O) - 1,44 % (m/V)

Fosfato de Potássio Monobásico (KH₂PO₄) - 0,24 % (m/V)

Solubilizados os sais em água destilada e esterilizado por autoclavagem.

A.1.1.22. Tampão PBS 1 X/Tween-20 0,1 % e 0,5 %

PBS (item 3.1.1.18) - 1 x (V/V)

Tween-20 - 0,1 ou 0,5 % (V/V)

Reagentes solubilizados em água destilada no momento do uso.

A.1.1.24. Tampão de fixação

Formaldeído - 3,7 % (V/V)

PIPES (item 3.1.1.25) - 50 mM

Sulfato de Magnésio (MgSO₄) - 5 mM

EGTA - 25 mM

Reagentes solubilizados em água MiliQ no momento do uso.

A.1.1.25. Tampão PIPES 250 mM pH 6,7

Solubilizado 75,6 g de PIPES em 70 mL de água MiliQ. pH ajustado para 6.7 com NaOH 5 M. Esterilizado por autoclavagem.

A.1.1.26. Tampão PEM

PIPES (item 3.1.1.21) - 50 mM

EDTA - 25 mM

Sulfato de Magnésio (MgSO₄) - 5 mM

Reagentes solubilizados em água MiliQ no momento do uso.

A.1.1.27. Tampão de digestão

Lysing Enzymes from T. harzianum (Sigma) - 50 mg.mL⁻¹

EDTA pH 7 - 5 mM

Reagentes solubilizados em uma solução de água e clara de ovo filtrada em filtros de poros de 0,45 µm na proporção de 1:1.

A.1.1.28. Tampão de extração

PIPES (item 3.1.1.25) - 100 mM

EDTA pH 7 - 25 mM

Nonidet P-40 - 0,1 % (V/V)

Reagentes solubilizados em água destilada no momento do uso.

A.1.1.29. Tampão de bloqueio

Albumina Sérica Bovina (Fração V) - 2,5 % (m/V)

Leite em pó desnatado - 1 % (m/V)

Soro Fetal Bovino Inativado - 8 % (m/V)

Reagentes solubilizados em água destilada no momento do uso.

A.1.1.30. Solução de PBS 1 x/BSA 3 % (m/V)

PBS (item 3.1.1.18) - 1 x

Albumina Sérica Bovina (Fração V) - 3 % (m/V)

Reagentes solubilizados no momento do uso.

A.1.1.31. Solução de DAPI 2,5 mg.mL⁻¹

5 g de DAPI solubilizados em 2 mL de água MiliQ filtrada. Diluição a 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para uso.