

Categorias de genes: CAZymes, Genes efetores, lipases, proteases, clusters de genes de metabólitos secundários e sua importância em microrganismos

Profa. Dra. Chirlei Glienke

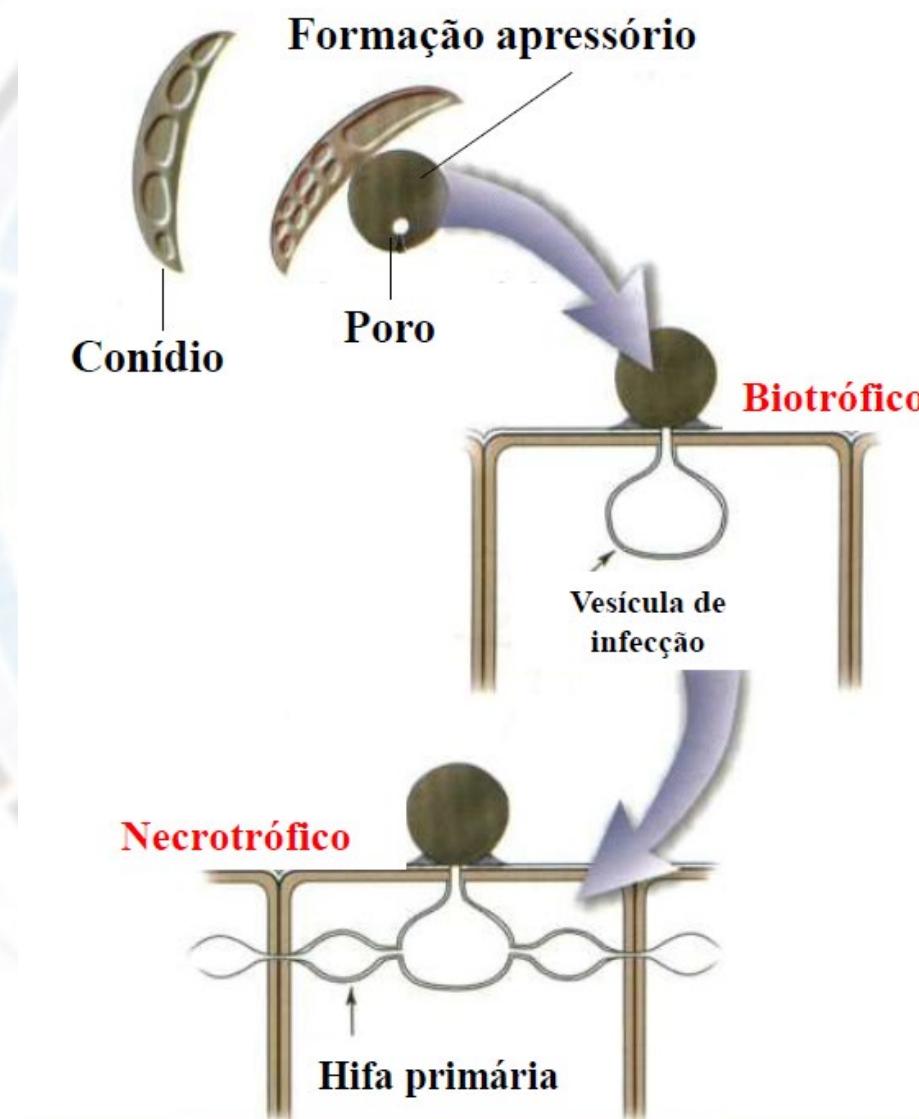
BIOGEMM-UFPR

GS Treinamentos e Consultoria

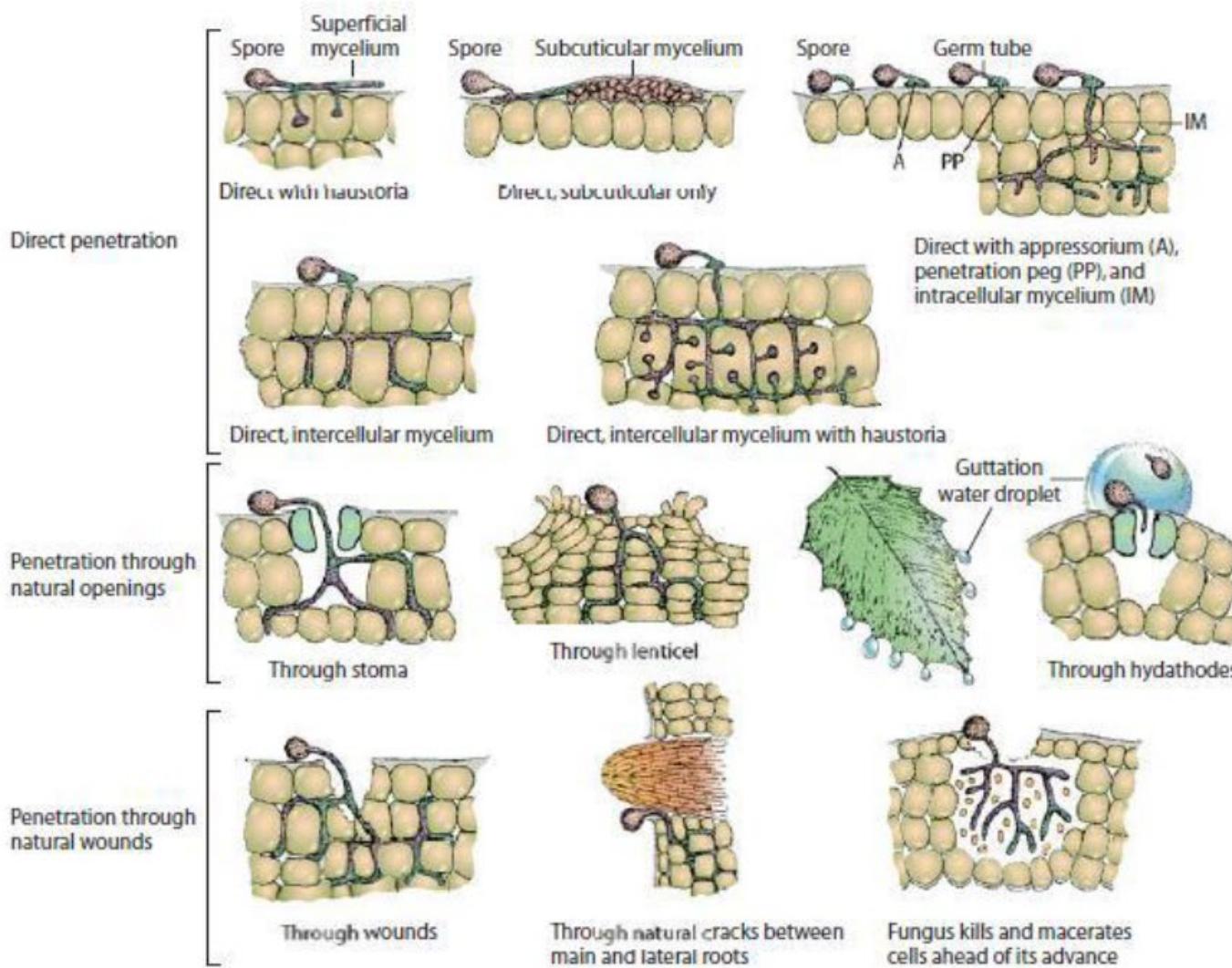
Processo de infecção fúngica

Mecanismos de ataque:

- Enzimas
- Toxinas
- Hormônios

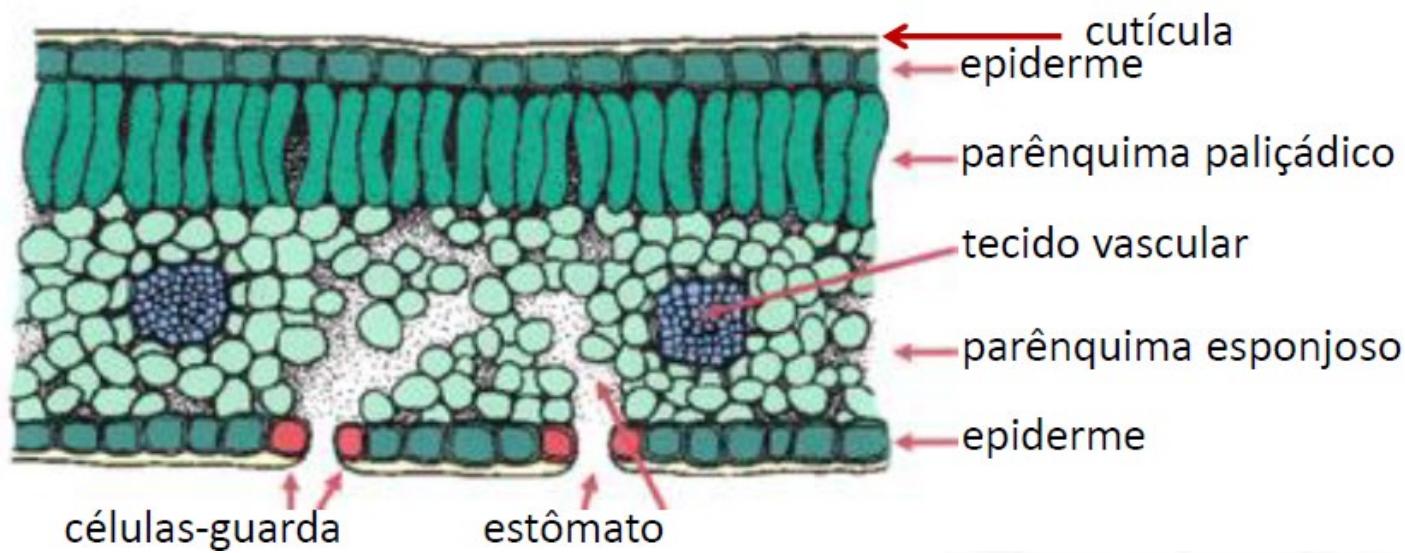
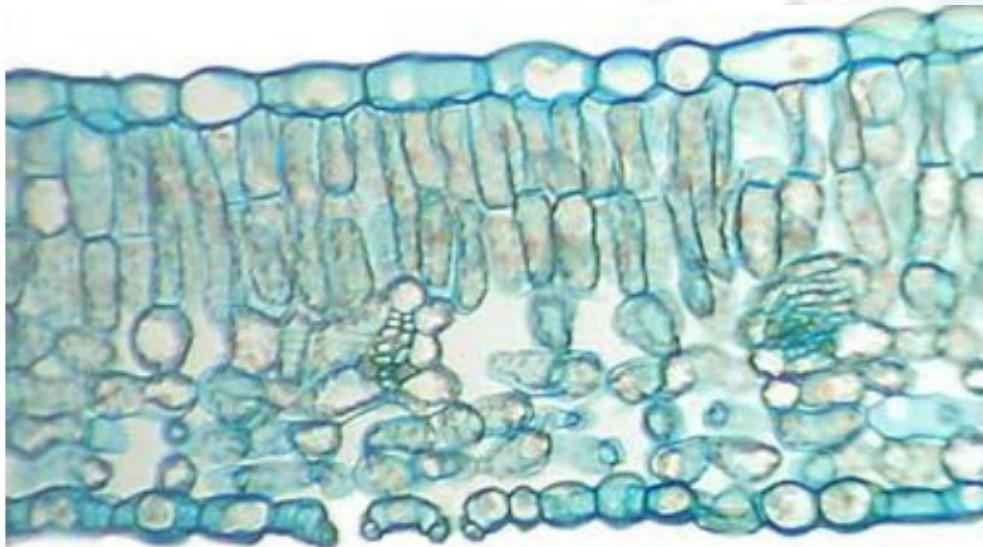


Vias de penetração pelos fungos

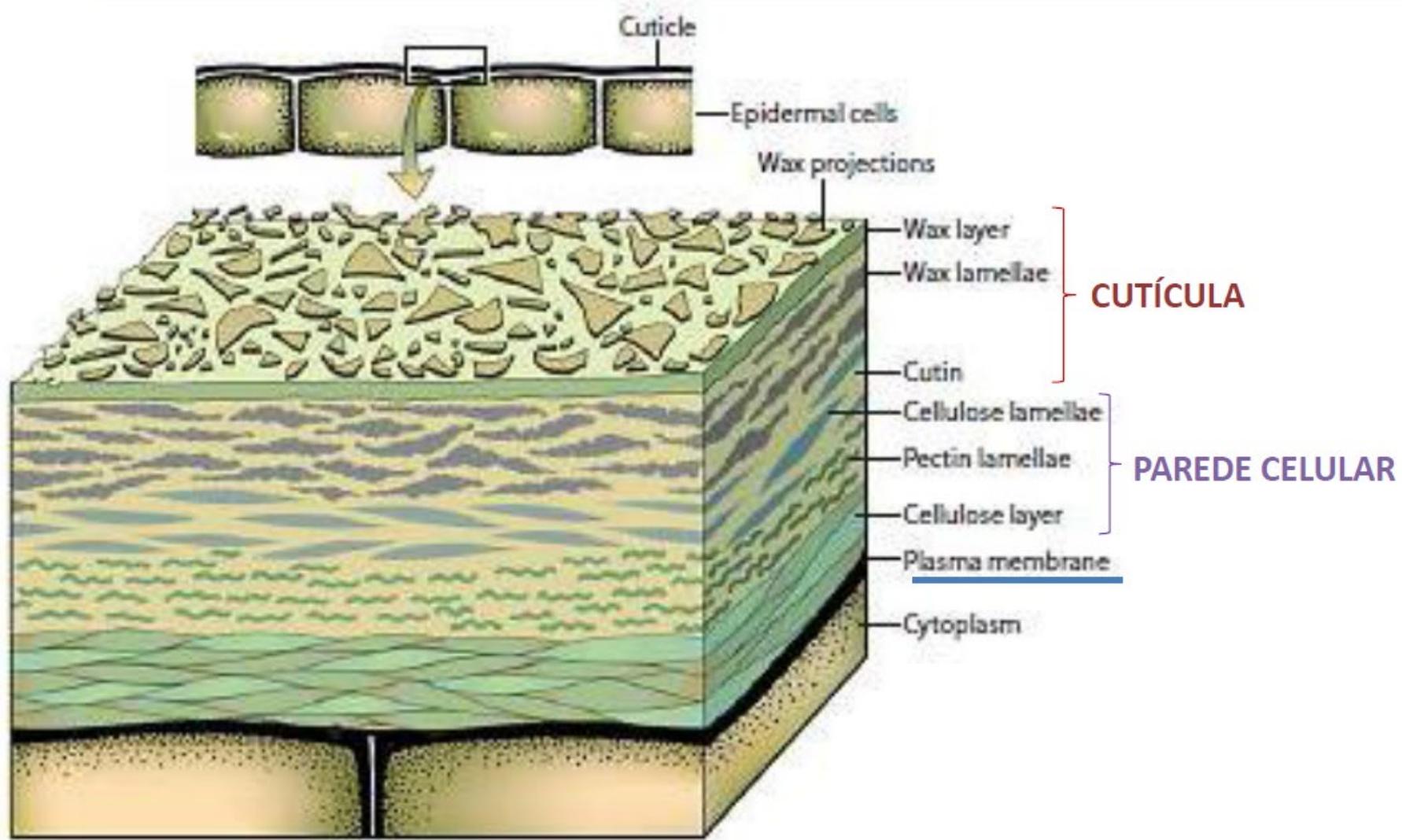


(Agrios , 2005)

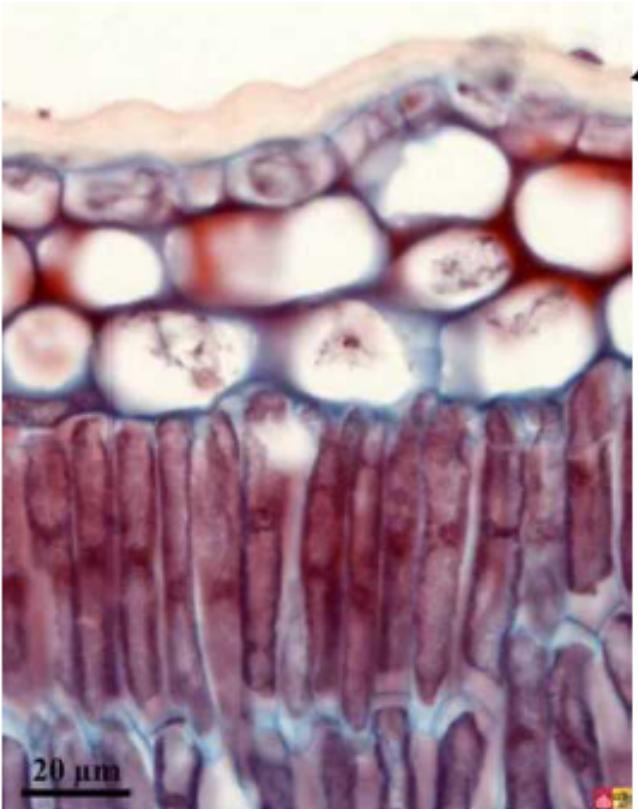
Tecido vegetal foliar



Estrutura da cutícula e da parede celular vegetal



Cutícula



CUTINASES

- Esterases que degradam a cutícula

- **Cutícula:** camada lipídica contínua, que recobre a *epiderme* de folhas, frutos e talos jovens.

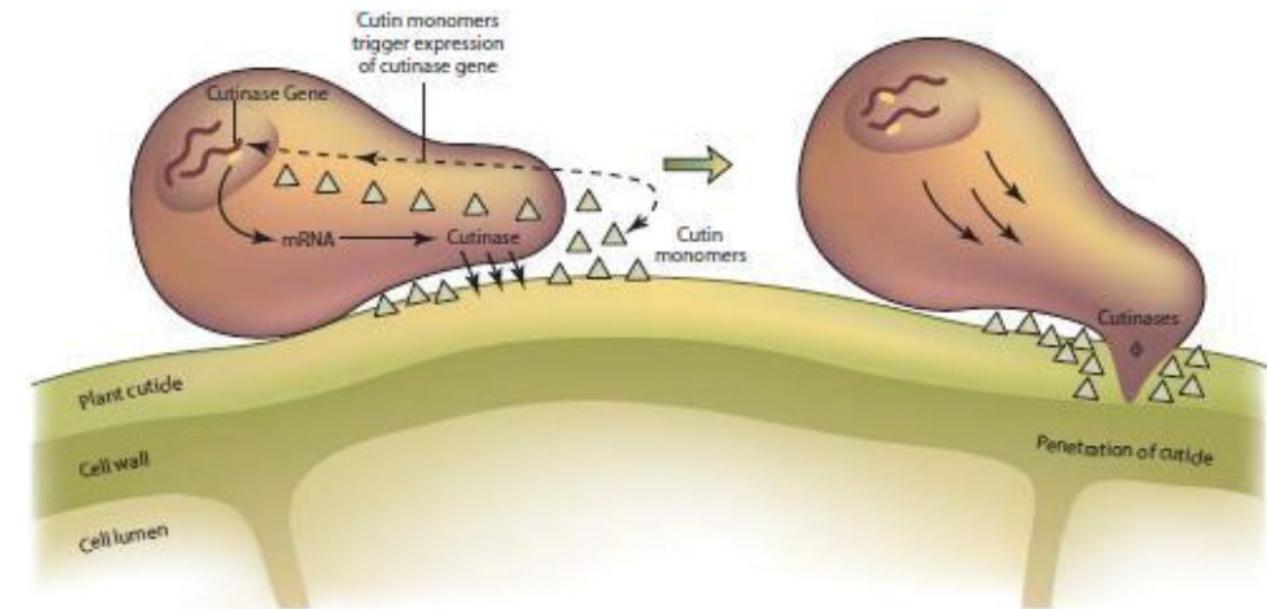
Função:

- evita a difusão de água e nutrientes para o ambiente externo
- protege a planta contra efeitos adversos e ataque de fitopatógenos.

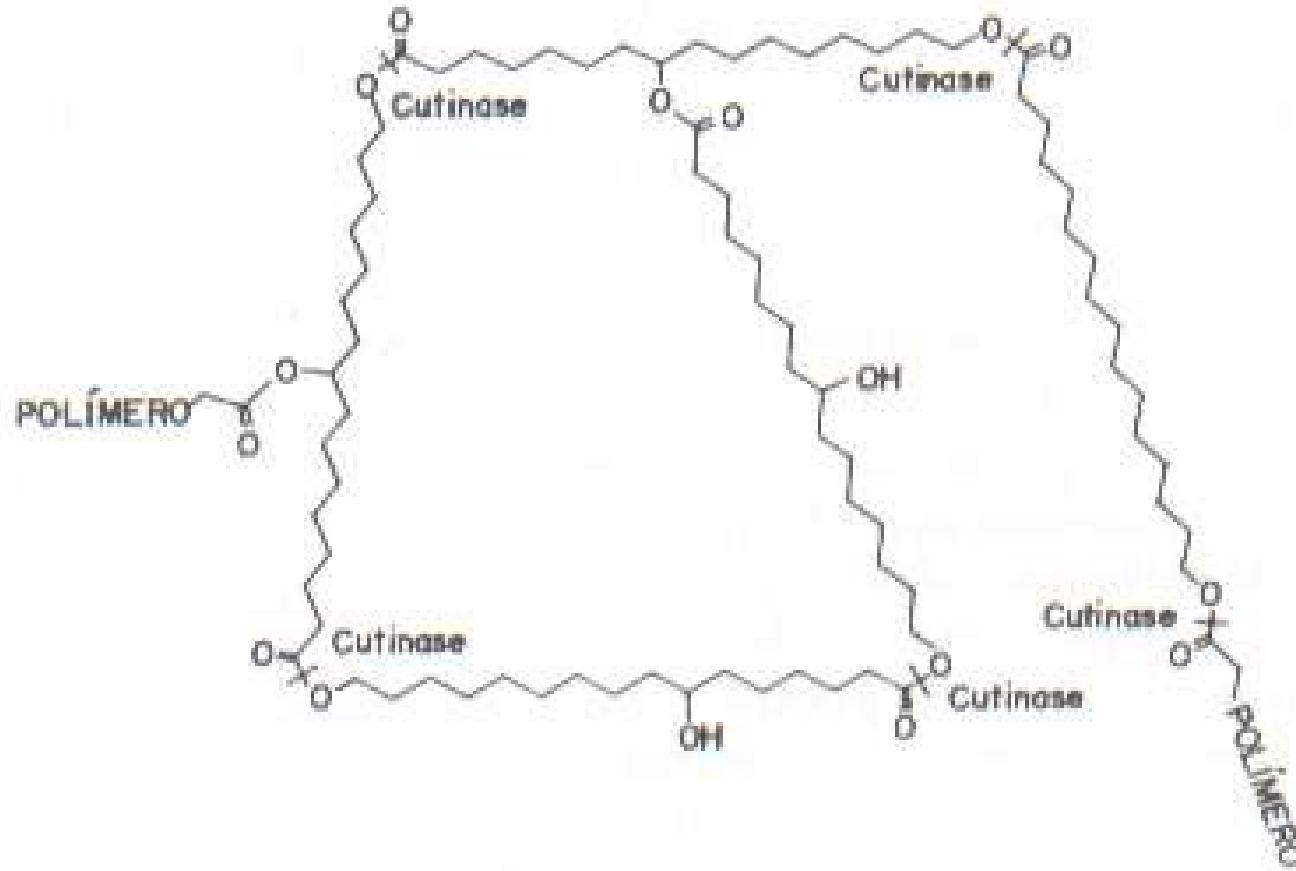
Componentes:

- compostos alifáticos (ceras)
- polímero insolúvel (**cutina**)

Colletotrichum gloeosporioides

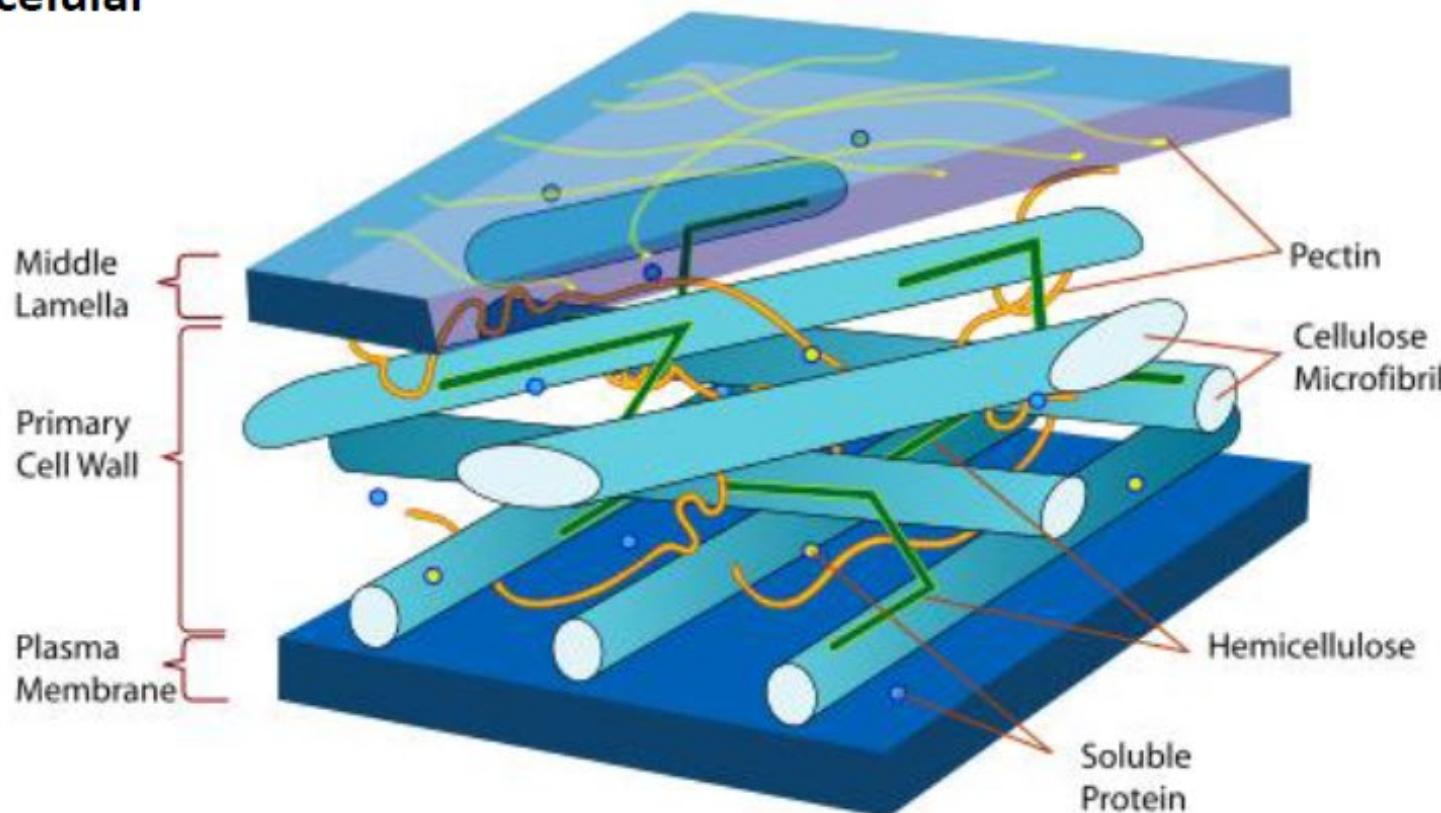


Cutinases



Parede celular

- Lamela média: entre as paredes celulares
- Parede primária: entre a membrana plasmática e a lamela média
 - somente em células em ativo processo de crescimento,
após a divisão celular ser completada
- Parede secundária: internamente à parede primária, formada após o término da expansão celular



LAMELA MÉDIA

Constituída por substâncias pécticas

- cimento intercelular
- gel amorfó composto por polissacarídeos (longas cadeias de ácido D-galacturônico)
- cadeias ligadas por íons de Cálcio
- 35% dicotiledôneas / 9% monocotiledôneas

PAREDE PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA

hemicelulose
celulose

HEMICELULOSE

- maior constituinte da parede vegetal primária
- misturas complexas de polissacarídeos:
Dicotiledôneas:

- **xiloglucana: parede primária**
– ligações glicosídicas β -1,4 e xilose β -1,6 com xilose
- **xilanás: parede secundária**
– xilose com ligações β -1,4

Monocotiledôneas:

- **arabinoxilanás: cadeias laterais de arabinose**
- **β -glucanas:** glicose unidos por ligações β -1,3 e β -1,4

CELULOSE

- Polissacarídeo (**glicose em ligações β -1,4**)
- 20-30% nas paredes primárias
- 40% parede secundária plantas lenhosas

Cell Wall Degrading Enzymes

CWDEs com atividade celulolítica

- Celulose:
 - β -1,4-homopolímero formado por unidades repetidas de celobiose (dissacarídeo de D-glicose)
- As enzimas celulolíticas:
 - Oxidorredutases (isto é, monooxigenases de polissacarídeo lítico,LPMOs)
 - Glicosil-hidrolases (ou seja, celulases)
 - três principais atividades:
 - endo-glucanase
 - exo-glucanase (ou seja, celodextrinase e celobiohidrolase)
 - β -glucosidase

CWDEs com atividade Hemicelulolítica

- Hemicelulose:
 - Polissacarídeo ramificado e altamente heterogêneo composto por: pentoses (por exemplo, xilose e arabinose), hexoses (por exemplo, manose, glicose e galactose) e açúcares ácidos (por exemplo, ácido galacturônico e glucurônico)
- Principalmente hidrolisada por glicosil-hidrolases
 - xilanases
 - Mananases
 - Galactanase
 - β -galactosidases
 - β -xilosidase
 - β -manosidasee
 - L-a-arabinofuranosidase

CWDEs com atividade Pectinolítica

- Pectina:
 - É um Ácido a- (1,4) -polissacarídeo ramificado que consiste principalmente de ácido D-galacturônico e de várias proporções de outros açúcares: L-ramnose, L-arabinose, D-galactosee D-xilose
 - Composta por diferentes domínios: homogalacturonan, xilogalacturonan, rhamnogalacturonanI e rhamnogalacturonan II
- É degradada por:
 - glicosil-hidrolases :
 - endo-poligalacturonases
 - exo-poligalacturonases
 - Liases:
 - pectato-liases

CWDEs com atividade ligninase

- Lignina:
 - é um polímero fenólico complexo derivado de monolignóis fenilpropanóides
 - conferem força e rigidez para a parede celular da planta
- Degradação principalmente catalisada por:
 - ligninases
 - lacases
 - polifenol-oxidases
 - (manganês) -peroxidases

CAZymes

- Enzimas degradativas:
 - 215 famílias com 680.000 sequências: glycoside hydrolases (GH), glycosyl transferases (GT), polysaccharide lyases (PL), and carbohydrate esterases (CE)

Table 1

The families of degradative enzymes in the CAZy database as of January 2019

Category	Families	Number of sequences in families ^c	Number of PDB structures in families
Glycoside hydrolases (GHs) ^a	GH1 – GH156	593 529	1391
Polysaccharide lyases (PLs)	PL1 – PL29	17 249	77
Lytic polysaccharide mono-oxygenases (LPMOs) ^b	AA9, AA10, AA11, AA13 – AA15	5166	39

^a Glycoside phosphorylases are found either in GH or in GT families depending on their evolutionary history.

^b LPMOs are found in the auxiliary activity category of CAZy that also lists a number of lignolytic enzymes.

^c As of January 2019; note that the CAZy database only lists proteins that have been released as finished entries in the daily releases of GenBank [2].

Modelo de degradação da parede celular vegetal pelo fungo *Neurospora crassa*

□ Glicose

□ Xylose

□ Xylobiose

□ Cellobiose

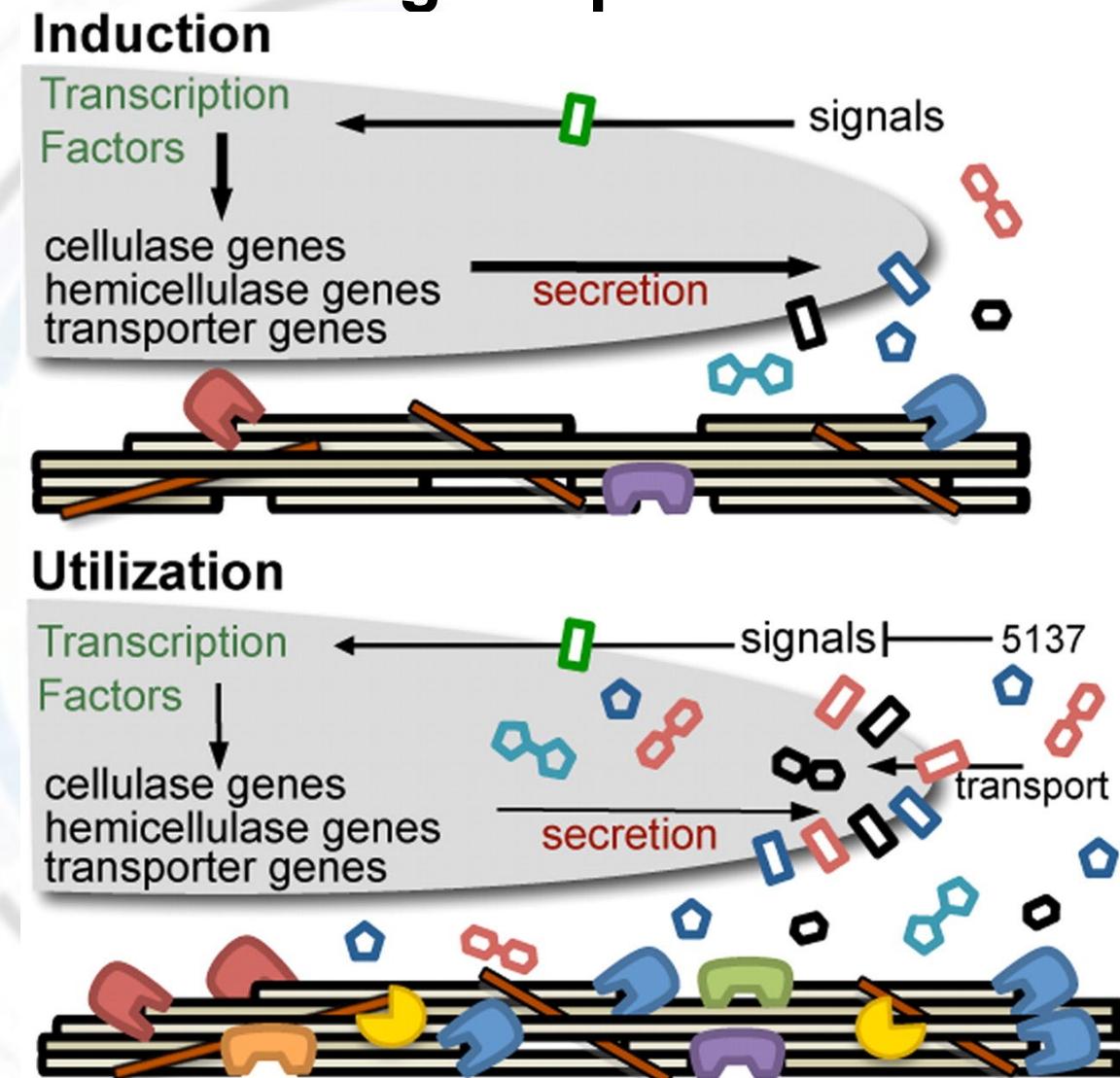
cellobiohydrolase(I) (CBHI)

cellobiohydrolase(II) (CBHII)

endoglucanases EG2

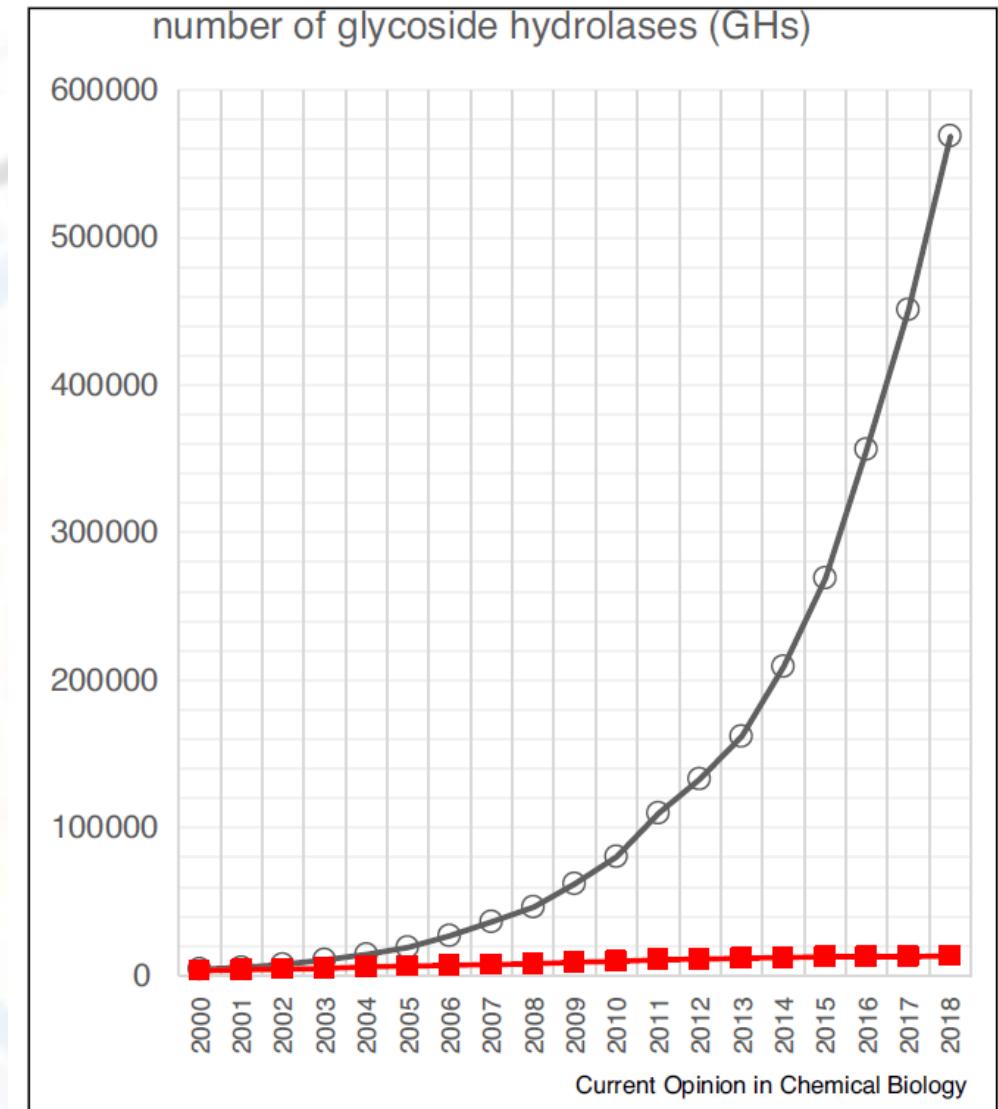
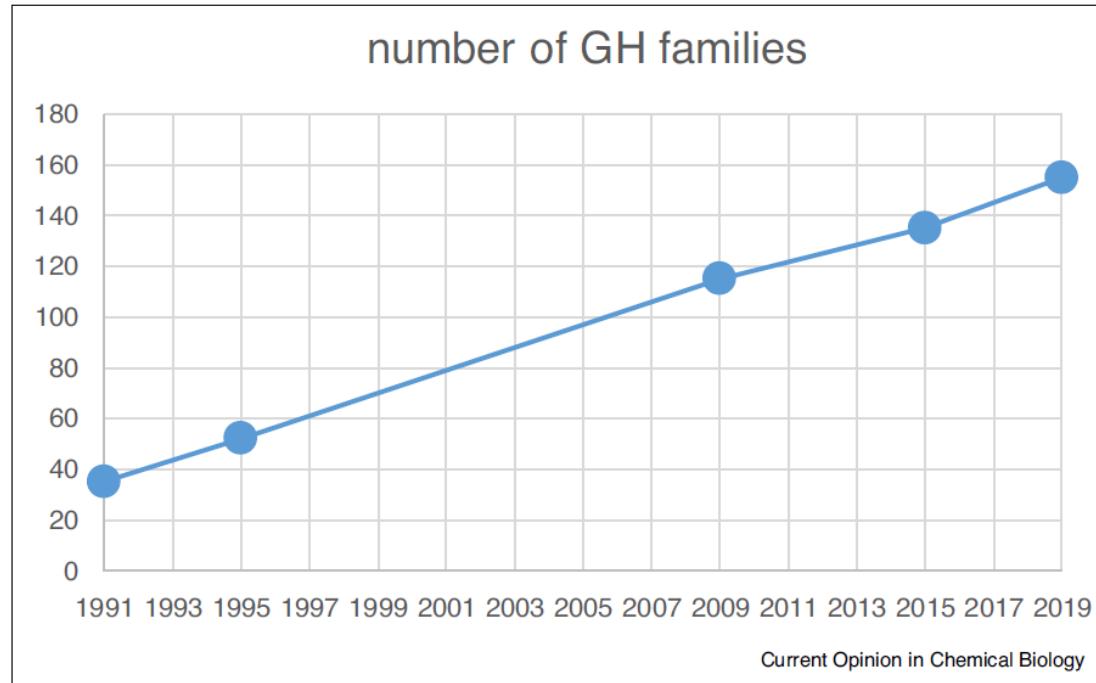
endoglucanases EG6

Xylanase



Glycoside hydrolases (GHs)

Crescimento de famílias GHs em função do sequenciamento de genomas

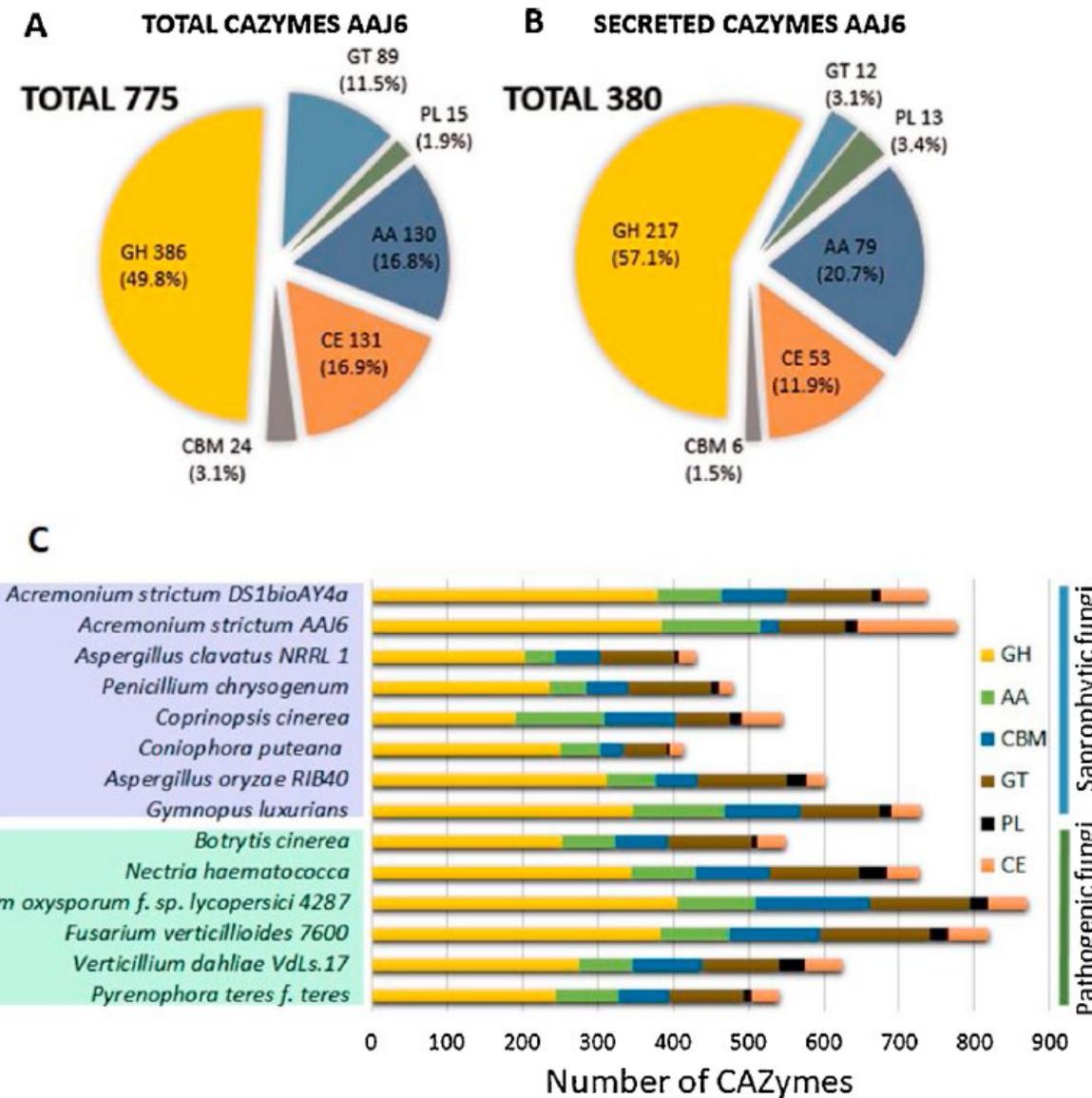


Growth of the number of GHs in the CAZy database. Black: number of sequences; red: number of biochemically characterized entries.

As 21 famílias de CAZymes degradativas descritas nos últimos 2 anos

Family	Mechanism	Activities	Fold	PDB	Clan
GH137	n.d.	β -L-arabinofuranosidase	β propeller (5 blades)	5MT2 [7 ^{••}]	
GH138	Retaining	α -galacturonidase	(β/α) ₈	6HZF [30]	
GH139	n.d.	α -2-O-Me-L-fucosidase			
GH140	Retaining	Apiosidase	(β/α) ₈	5MSY [7 ^{••}]	
GH141	n.d.	α -L-fucosidase, xylanase	β -helix	5MQP	
GH142	n.d.	β -L-arabinofuranosidase	(α/α) ₆	5MQR [7 ^{••}]	
GH143	Retaining (inferred)	2-keto-3-deoxy-D-lyxo-heptulosaric acid hydrolase	β propeller (5 blades)	5MQR [7 ^{••}]	
GH144	Inverting	Endo- β -1,2-glucanase	(α/α) ₆	5GZK [17 [•]]	
GH145	Retaining	L-Rha- α -1,4-GlcA α -L-rhamnohydrolase	β propeller (7 blades)	5MVH [9]	
GH146	Retaining	β -L-arabinofuranosidase	(α/α) ₆	5OPJ [8 [•]]	GH-P
GH147	Retaining (inferred)	β -galactosidase	(β/α) ₈ (inferred)		GH-A (inferred)
GH148	Retaining (inferred)	β -1,3-glucanase	(β/α) ₈ (inferred)		GH-A (inferred)
GH149	Inverting	β -1,3-glucan phosphorylase	(α/α) ₆	6HQ6 [31]	GH-Q
GH153	n.d.	poly- β -1,6-D-glucosamine hydrolase	(β/α) ₈	6AU1 [18 [•]]	
GH154	n.d.	β -glucuronidase			
GH156	Inverting	Exo- α -sialidase			
PL27	β -elimination	L-rhamnose- α -1,4-D-glucuronate lyase	(α/α) ₆	5NO8 [11]	
PL29	β -elimination	Hyaluronate lyase chondroitin-sulfate ABC endolyase dermatan sulfate lyase			
AA14	C-1 oxidation	Lytic xylan monooxygenase	Antiparallel β -sandwich	5NO7 [22 [•]]	
AA15	C-1 oxidation	Lytic cellulose monooxygenase lytic chitin monooxygenase	Antiparallel β -sandwich	5MSZ [23 [•]]	

CAZymes em *Acremonium strictum*



CAZymes (Carbohydrate-active enzymes)

- Várias classes de enzimas que catalisam a montagem e a quebra de oligossacarídeos e polissacarídeos
- Oligômeros e polímeros de carboidratos:
 - representam a maior parte do carbono fixado na fotossíntese
 - são utilizadas por quase todos os organismos vivos (autotróficos ou heterotróficos) para energia, estrutura e uma infinidade de sinalização intra e intercelular
 - Participam das interações patógeno-hospedeiro

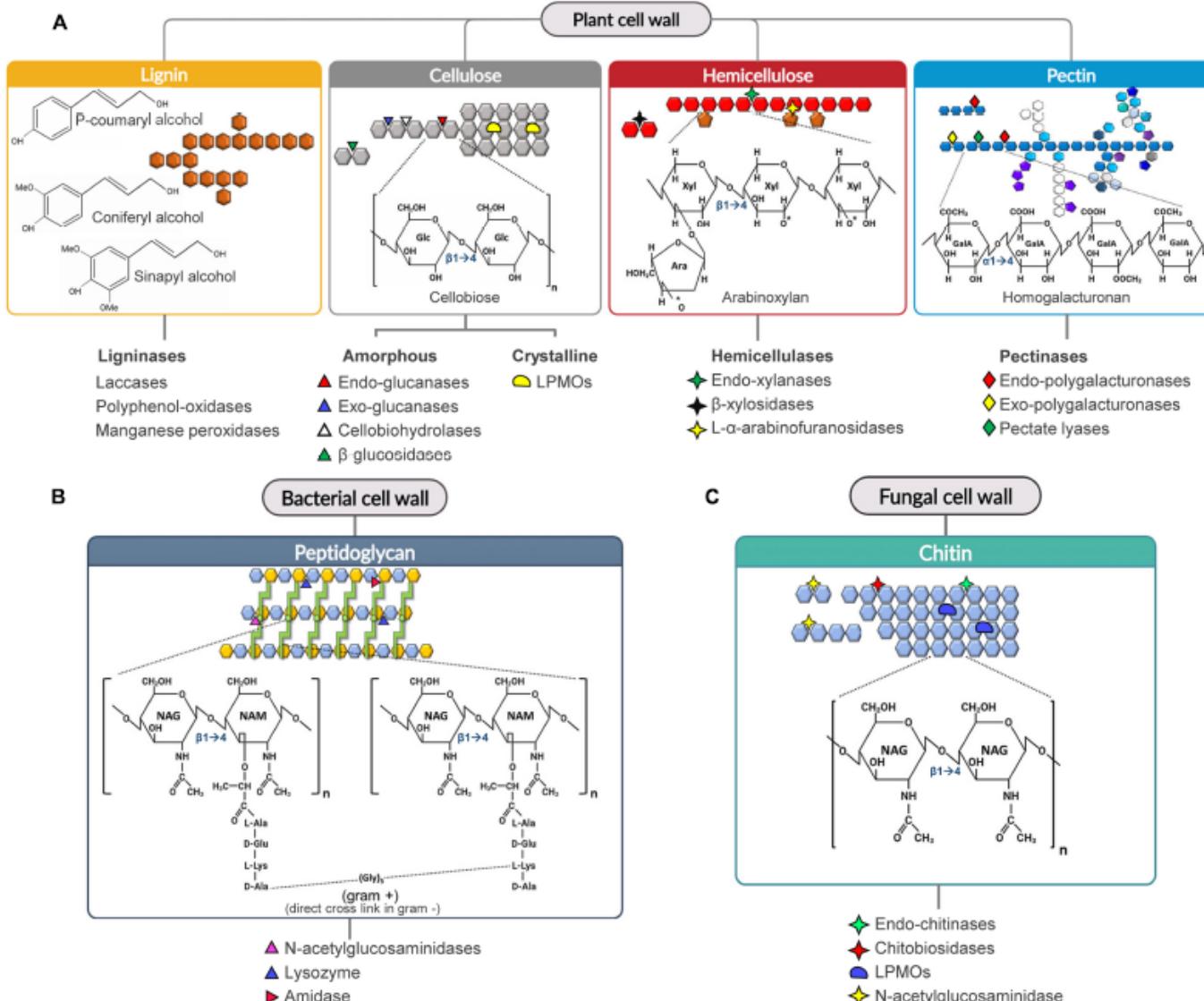
CAZymes

- Em fitopatógenos:
 - CAZymes envolvidas em:
 - Degradação da parede celular do hospedeiro (penetração e colonização)
 - Fonte de carboidratos para crescimento (nutrição do patógeno)

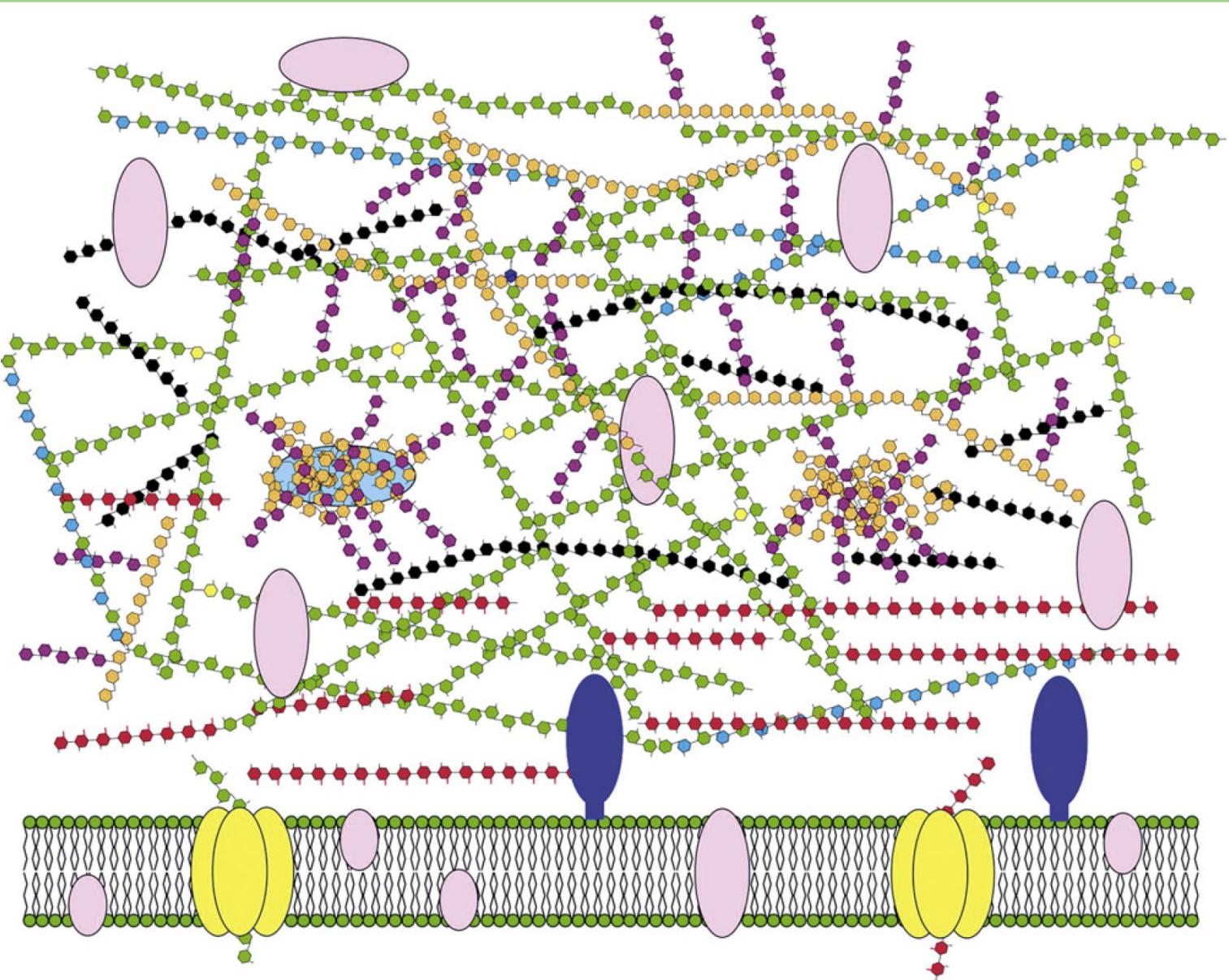
Classes de CAZymes

- glycosyltransferases (GTs)
- glycoside hydrolases (GHs)
- polysaccharide lyases (PLs)
- carbohydrate esterases (CEs)
- CAZymes do tipo cell wall degrading enzymes (CWDEs): degradação da parede celular vegetal por fungos e bactérias

Principais CWDEs

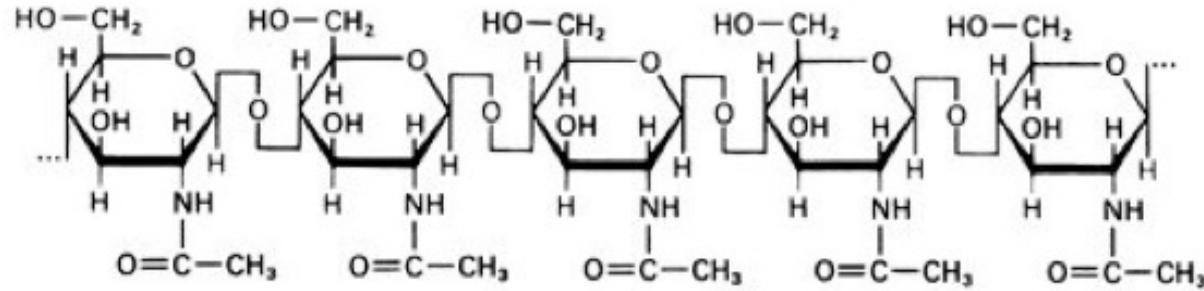


Parede celular do fungo *Aspergillus fumigatus*

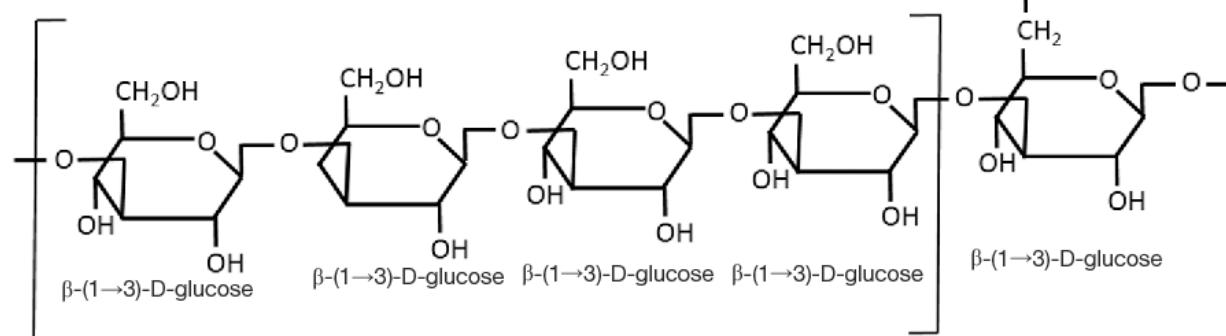
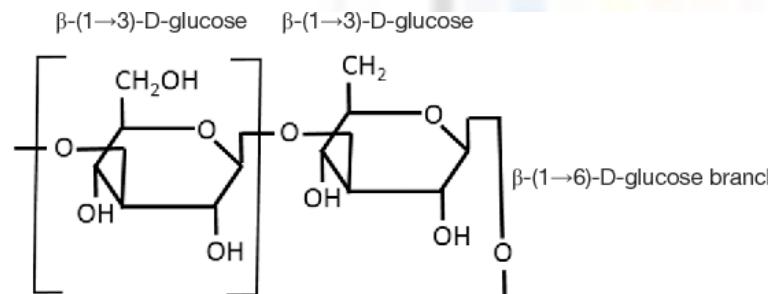


Abad et al. 2010 Rev. Iberoam. Micol. 27: 155-182.

Estrutura de chitin, β -glucan e galactomannan

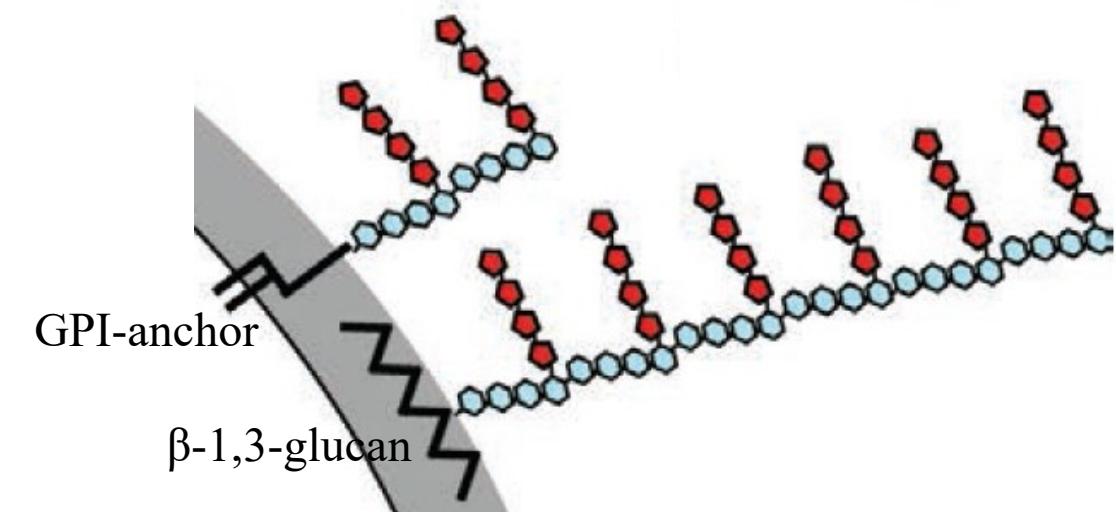
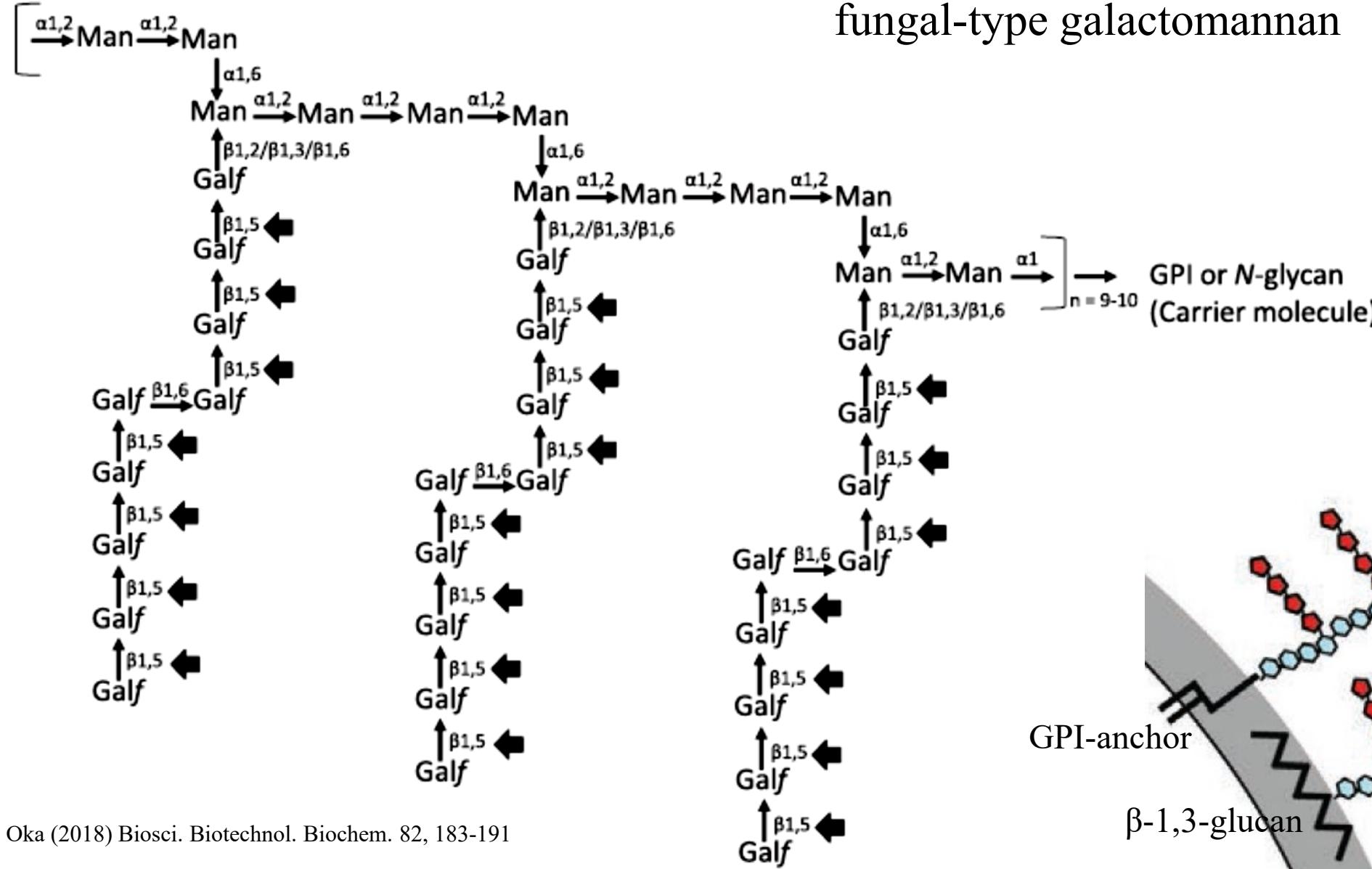


β -1,4-linked *N*-acetyl glucosamine

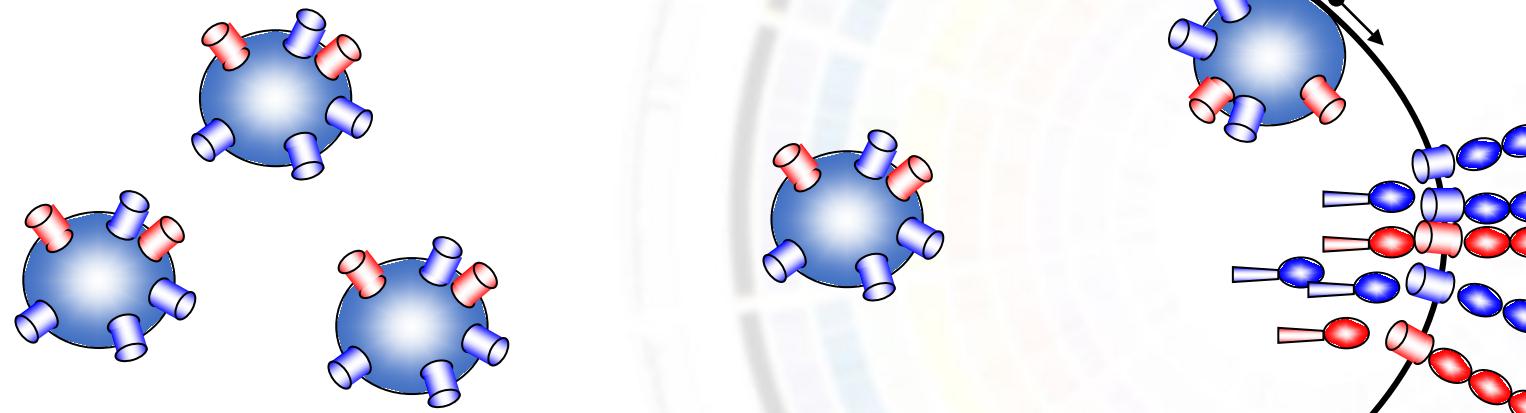


β -1,3/ β -1,6-linked glucan

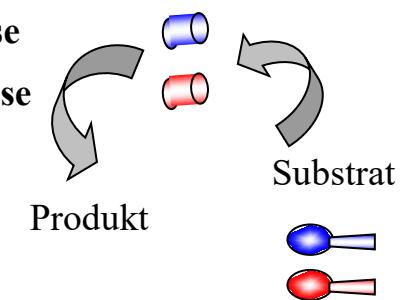
Estrutura de chitin, β -glucan e galactomannan



As vesículas secretoras se fundem com a membrana plasmática e integram quitina e β -1,3-glucana sintase

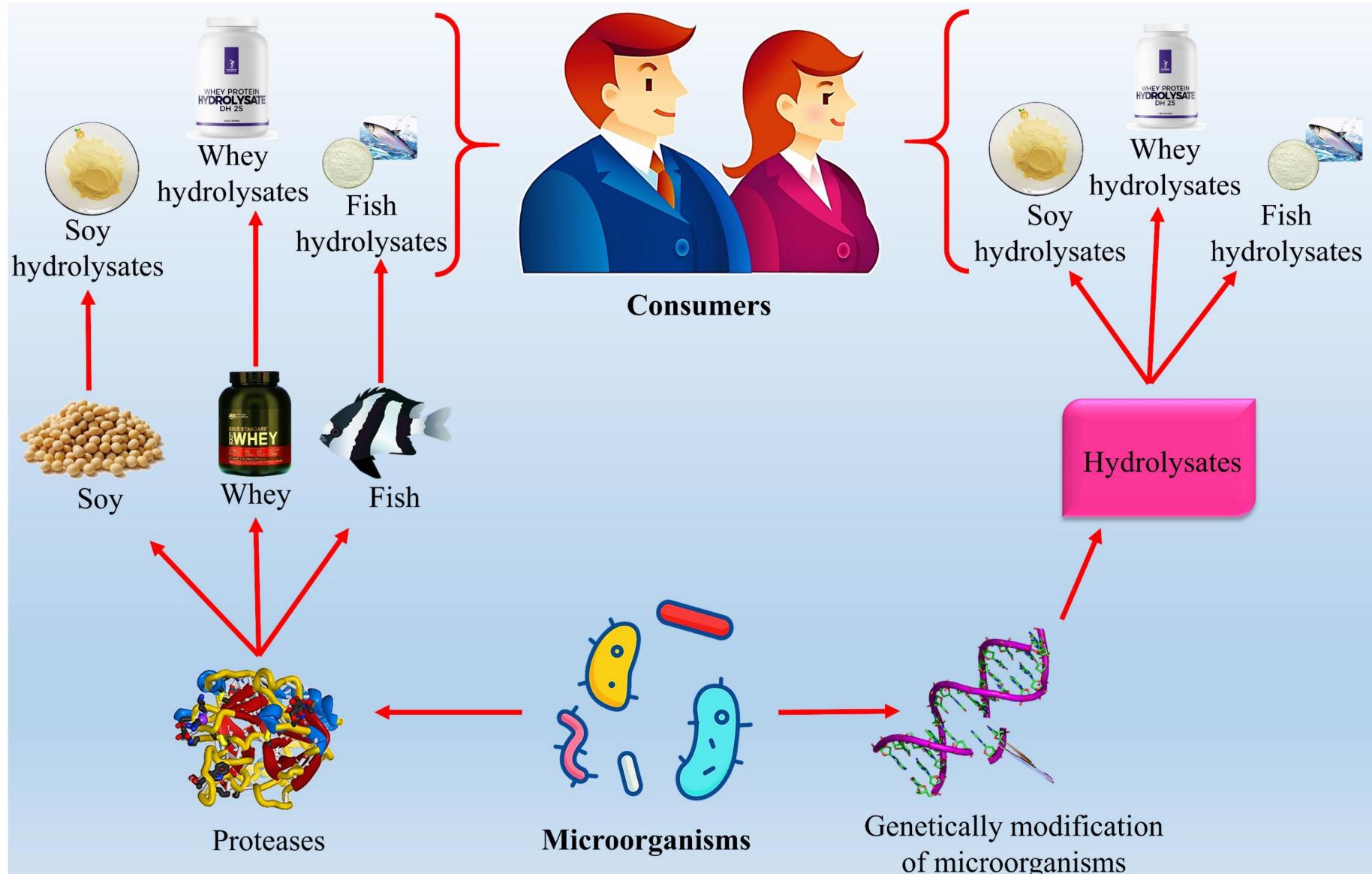


Chitin Synthase
Glucan Synthase



UDP-GlcNAc
UDP-Glc

Aplicação de proteases fúngicas na indústria de alimentos



Características de diferentes enzimas fúngicas

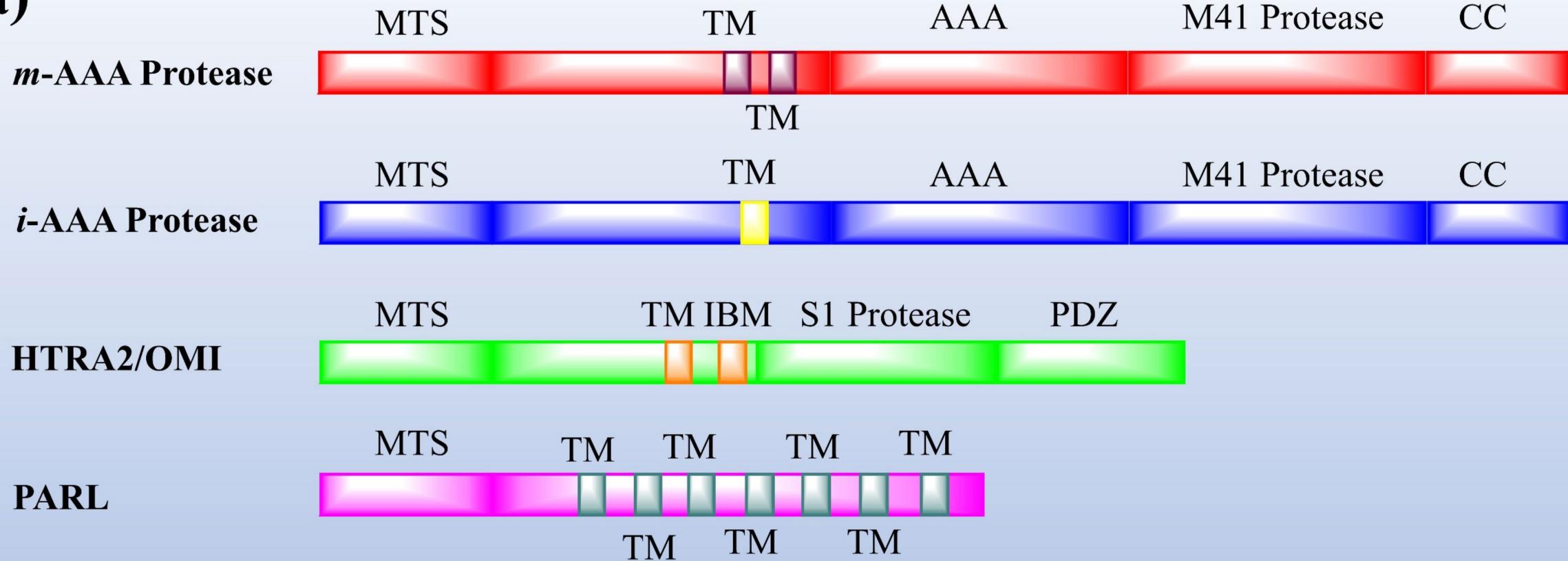
Enzyme Class	Type of Strain	Production Method	Mol. Weight (kDa)	Opt. pH	Opt. Temperature (°C)	Substrate	Inhibitors	Enzyme Activity (%)
Fungal amylase	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	SSF	33	5	48	Wheat straw, guayule bagasse	SDS	88
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	SmF	28	4.5	30	Pomegranate peel, wheat bran	Ebselen	90
	<i>Cryptococcus flavus</i>	SSF	70	5	45	Starch, amylose	Mercury	80-84
	<i>Aspergillus niger</i>	SSF	115	5	75	Cowpeas, chickpeas		88
	<i>Mucor</i> sp.	SSF	38	4	30	Kidney beans, lupine	EDTA	84-86
	<i>Aspergillus oryzae</i>	SSF	102	8	30	Groundnut oil, sesame oil	Copper	85
	<i>Aspergillus kawachii</i>	SSF	110	3	32	Pearl millet	Mercury	88-90
	<i>Penicillium fterreus</i>	SSF	25	6	28	Cowpeas, chickpeas	Lead	78
Fungal cellulase	<i>Trichoderma viride</i>	SSF	55	7	52	CMC	Mercury	86-88
	<i>Peniophora</i> sp.	SmF	30	4	58	SKT	EDTA	80
	<i>Aspergillus niger IMM1</i>	SSF	70	3.5	32	RW, bread	Mercury	90
	<i>T. harzianum</i>	SSF	40	5	70	Sugarcane bagasse	EDTA	85
	<i>Aspergillus niger VTCC-F021</i>	SSF	29	4	52	Sugar cane, CMC	Zinc	95
	<i>Aspergillus terreus</i>	SmF	52	3.5	13	Cowpeas, chickpeas	Mercury	78
	<i>Aspergiillus niger</i>	SSF	30	3	40-48	Coir waste, RH	Zinc	88
	<i>A. terreus</i>	SmF	35	3.5	48	MOC	α-Glucosidase	85
Fungal lipase	<i>A. versicolor</i>	SmF	93	7	60	EMO	Lipstatin	90
	<i>A. tamarii</i>	SSF	5	4.5	55	GOC, agrowastes	Ebelactone	92
	<i>A. japonicus</i>	SmF	9	4.6	25	SFO, casein	Caulerpenyne	88
	<i>Mucor</i> sp.	SmF	7	4.2	28	Kidney beans, lupine	Percyquinin	66
	<i>Scopulariopsis</i> sp.	SSF	38	8	56	Glucose, peptone	NBS	88
	<i>Aspergillus niger</i>	SSF	47	7	45	Cowpeas, chickpeas	EDTA	88
Fungal protease	<i>Aspergillus fumigatus</i>	SSF	40	8	31	PL, casein	DTT	90
	<i>Rhizopus oryza</i>	SmF	55	5	32	WBW	DTT	75
	<i>Mucpr</i> Sp.	SSF	35	7	28	Kidney beans, lupine	EDTA	88
	<i>G. putredinis</i>	SmF	48	7-8	29	Soya bean meal	IAA	85
	<i>T. harzianum</i>	SSF	45	7	19	Glutamine	PMSE	80-82

Co-produção enzimática

Fungal Strain	Nature	Genus	Opt. Temperature (°C)	Fungal Amylase	Fungal Cellulase	Fungal Lipase	Fungal Protease	Application
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Thermophilic fungus	<i>Thermomyces</i>	40-50	✓	✗	✓	✓	Wastewater and pharmaceuticals waste treatment
<i>Sporotrichum thermophile</i>	Thermophilic fungus	<i>Sporotrichum</i>	45-50	✗	✓	✗	✓	Biomass degradation
<i>Myceliophthora thermophila</i>	Thermophilic fungus	<i>Myceliophthora</i>	45-50	✗	✓	✗	✓	Textile industries and bioremediation
<i>Thermomyces ibadanensis</i>	Thermophilic fungus	<i>Thermomyces</i>	46-55	✗	✗	✓	✓	Wastewater treatment
<i>Neurospora crassa</i>	Mesophilic fungus	<i>Neurospora</i>	20-30	✗	✓	✗	✓	As a model organism in an analysis of genetic recombination
<i>Aspergillus niger</i>	Mesophilic fungus	<i>Aspergillus</i>	20-30	✓	✗	✗	✓	Food industries
<i>Aspergillus flavus</i>	Mesophilic fungus	<i>Aspergillus</i>	25-30	✓	✓	✗	✓	Textile, detergent, and paper industries
<i>Candida mogii</i>	Psychrophilic fungus	<i>Candida</i>	5-10	✓	✗	✓	✓	Food industries

Proteases produzidas por fungos - estrutura

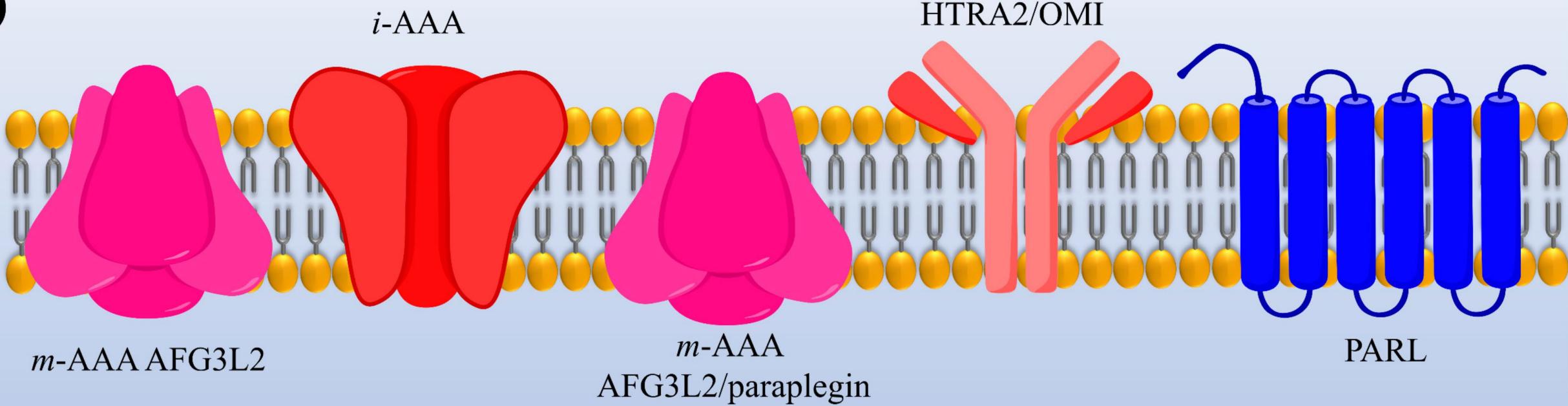
(a)



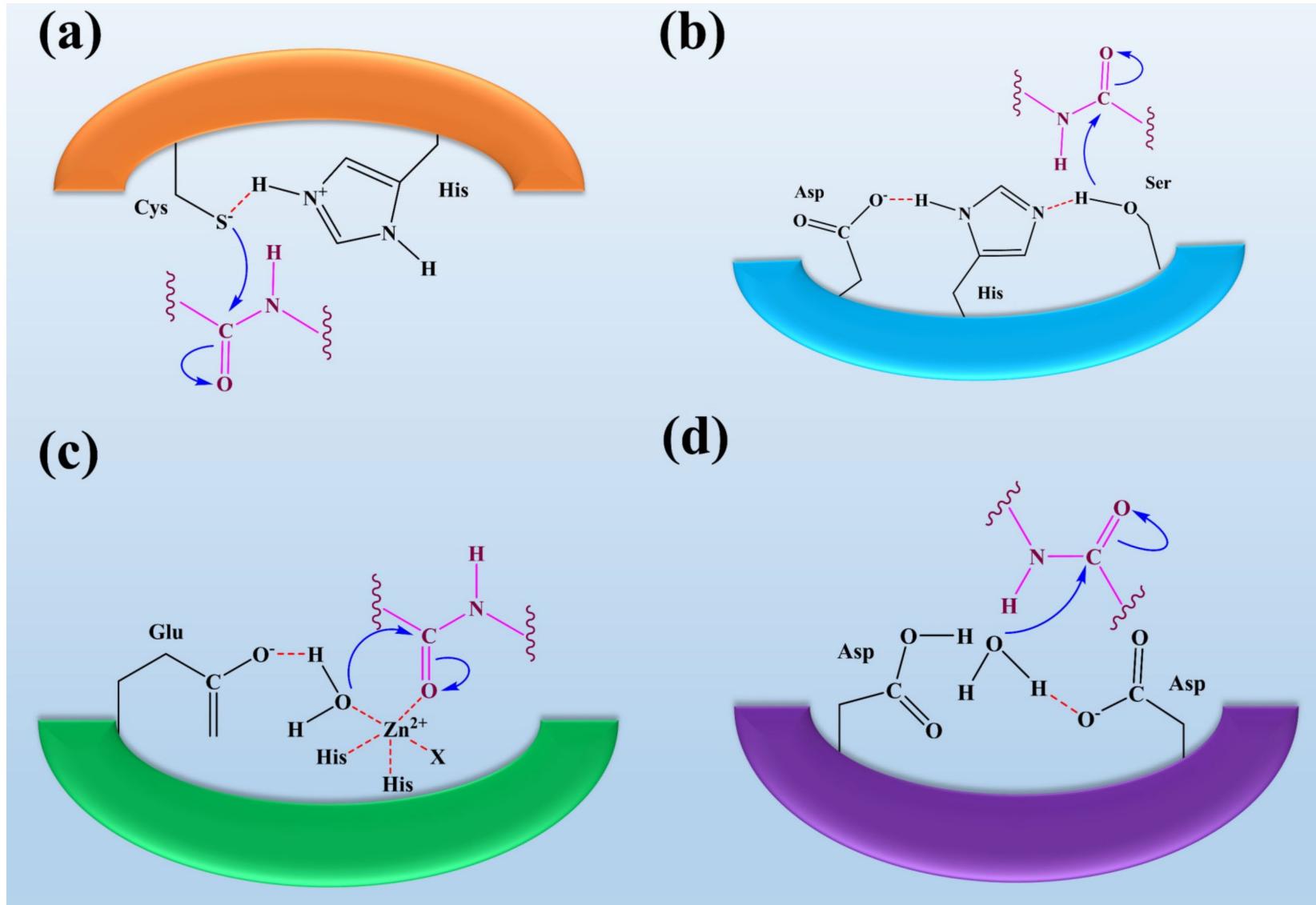
TM: domínio transmembranar, IBM: motivo de ligação do inibidor de apoptose (IAP), MTS: sequenciamento de direcionamento mitocondrial, IMS: espaço intermembranar, CC: bobina espiralada, AAA: domínio triplo A, M41: domínio proteolítico de ligação de metal de protease, protease S1: domínio de protease semelhante a tripsina.

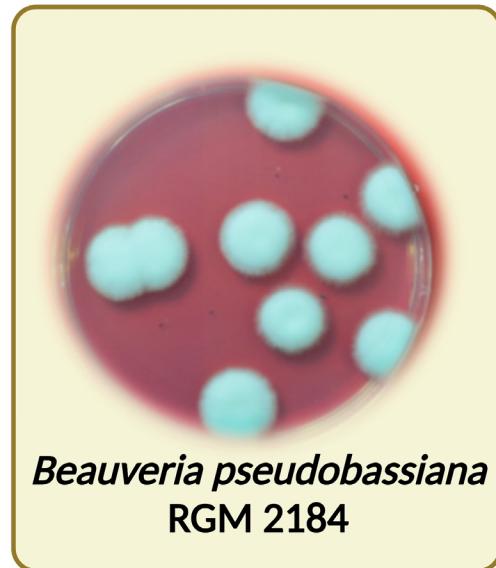
Proteases produzidas por fungos - topologia

(b)

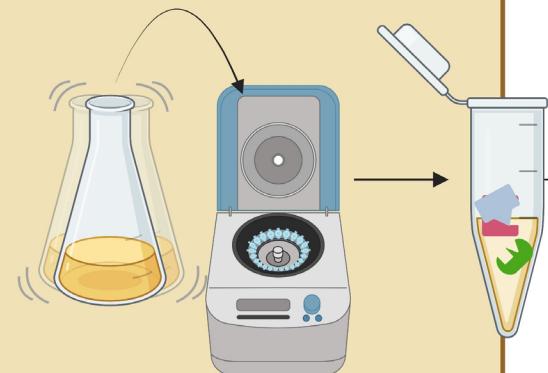


Representação dos mecanismos de protease fúngica de (a) serina proteases (b) aspartil proteases, (c) metaloproteases e (d) cisteína proteases



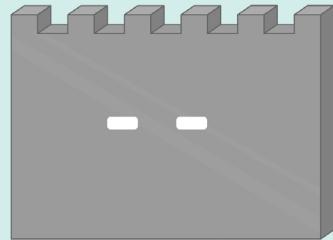


Exoenzymes extraction



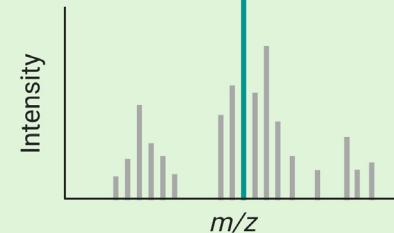
Detection

Zymography



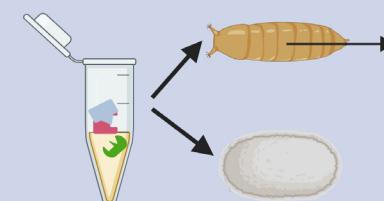
Identification

Mass spectrometry analysis of protein extracts



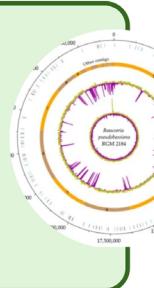
Evaluation

Exposure of cocoon and pupa (*L. botrana*) to enzyme extracts



25°C
10°C

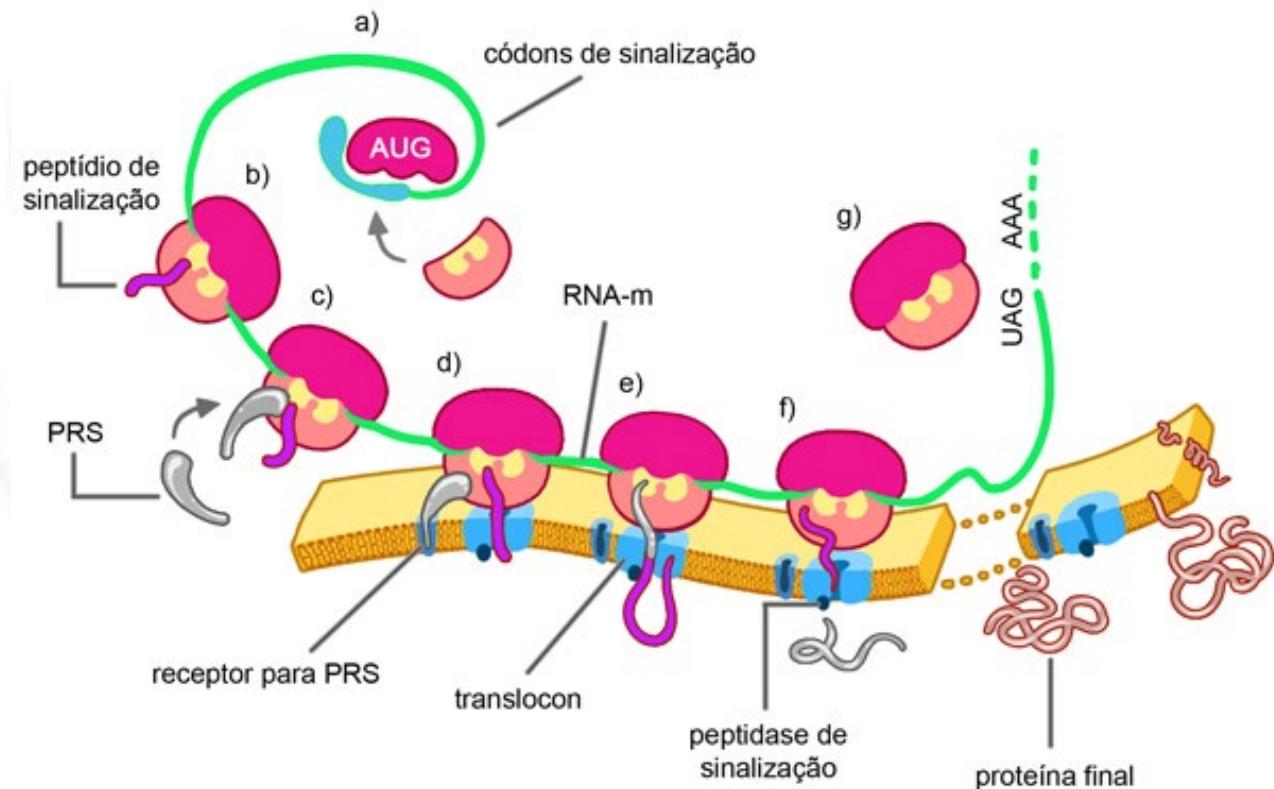
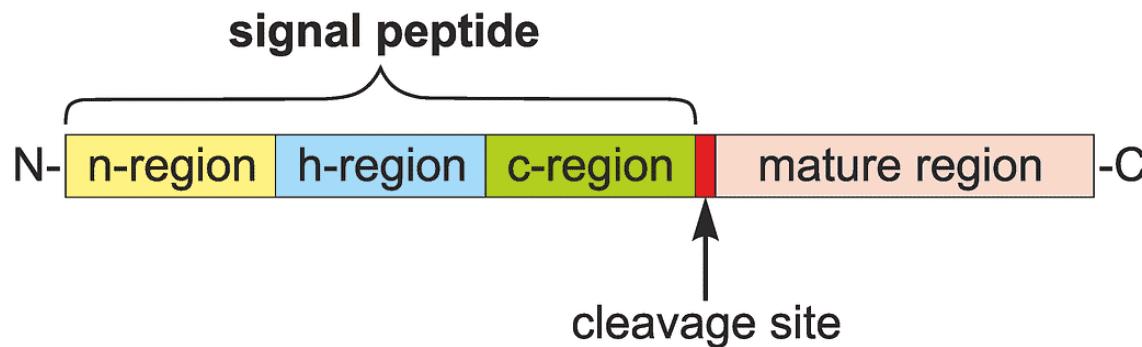
Observation of damage by scanning electron microscopy



Peptído sinal

- sequência que possui entre 15 e 30 aminoácidos
- motivo encontrado geralmente na extremidade N-terminal de proteínas
- marcar as proteínas que serão exportadas para determinados locais, como por exemplo, o ambiente extracelular
- a proteína é sintetizada no lúmen do retículo endoplasmático

Peptídio sinal



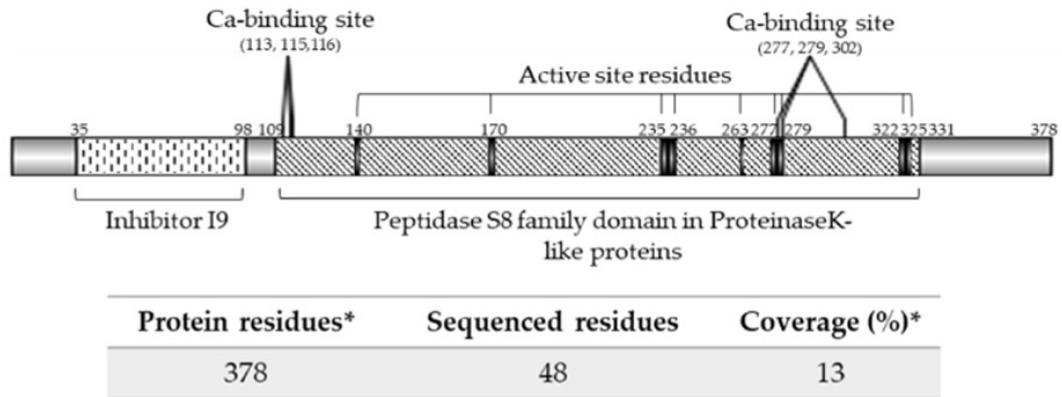
Proteases extracelulares identificadas no extrato protéico do sobrenadante de cultura da cepa RGM 2184 em meio M2

1 MRLSIIAAAL PLAIAAPVVE PAPLLEARQG TIAGKYIVKL KDTATIGIMD
51 AASKVPNTEH **VYENVIKGFS** ASLNQEQLDR LRHDPVETI EQDAIVSINA
101 IVRQTGAPWG **LGRISHRAKG** DTTYVYDSNA GAGTCVYVID TGVAEEHPEF
151 QGRAVQLKTF VSGTKDGHGH GTHCAGTIGS AKYGVAKKTS IFGVKVLEDS
201 GSGSLSGVIA GMDFVATDFR KQSKCSKGAV **ASMSLGGGFS** ATVNQAAARL
251 QSAGVFVAVA AGNDNSDAQG TSPASEPSVC TVGATDSSDR RSTFSNYGKV
301 VDIFAPGTGI LSTWLNGTT **ISGTSMATPH** IAGLGAYLLG LGKGSADGIC
351 KIIQISTKNV LTGVPAGTFN YLAFNGAT

1 MVRTSALLTL LATAATAVG QDAEIGKEQP AIPGAIFIIEF KEGSNNAAV
51 DAVAQDATIR VDLDLFELFKG VSIQLNDVNS ADEKAKTLAS LPAVKNIWPV
101 KLVPRPDPNI EWVATEGLQA LVDKSGASNI NSRDTAEPIS **SAQRMGQIDK**
151 **MR**AKGYKGRG IKVAVVDTGI DYKHPALGRC FGEGLVGYG YDLVGDAYGS
201 NGNYRPVPDN DPMDCGGHGS HVAGIIAAQP NEYNFTGTAP DVTLGAYKVF
251 GCGSGSTGTDV **LISS**FNKAYQ AGSDIITASI GGSSGWVDEP WALSIARIVA
301 RGVPCTIAAG NEGTEGLLFA SSGFCKGSV AVASFNTDT PTLANVNYYS
351 VDGGDKQQLL TTGSSKDAWD GTVLDLWAGS YDTTKAADDGC KAYPADTPDL
401 **SDKIVL**IHRG TCSFNDKVNF ATAKGAKYVI IYNNAAPLIS MDVTNTPLAK
451 GITLISQDDG VTLINLLKG KKVTASMNSS AKTAKVLSYK QNSVTGGGLS
501 SFTTWGPSWE LFVKPDVGAP GGNILSTYPT AKGSWAFLSG **T**SMATPFVAA
551 SVALLLEVRG KKLPPATITN LLSANANPQL FNDNTKFLGK LAPVPQQGAG
601 LVQVYDAFAA TTLLEPSNLA FNDTANFVKK LTFKVSN^TGK ESVSYDISQV
651 SAYTMYALGT SGTHVKAFFN EAVDAYAKLS FSQDKLTIAA GSSASDVTV
701 SPPEGVDTKR LPIWSGYVTI NGTDGTALSM PYQGVSGSLK EHVVVDP^TGA
751 SWISWSNDKE LKELPVNMTF SLPAPGKATG QTRLPMFVIN MSLGSKNITG
801 HLQPMTTCCP KGAYEYKGK TIGQPFDFPL LFSSRGPVTS **PWDGQLES**GN
851 **YAPPGKYRI** IRALRVFGDP NNEKDWDTSV GNRFVI

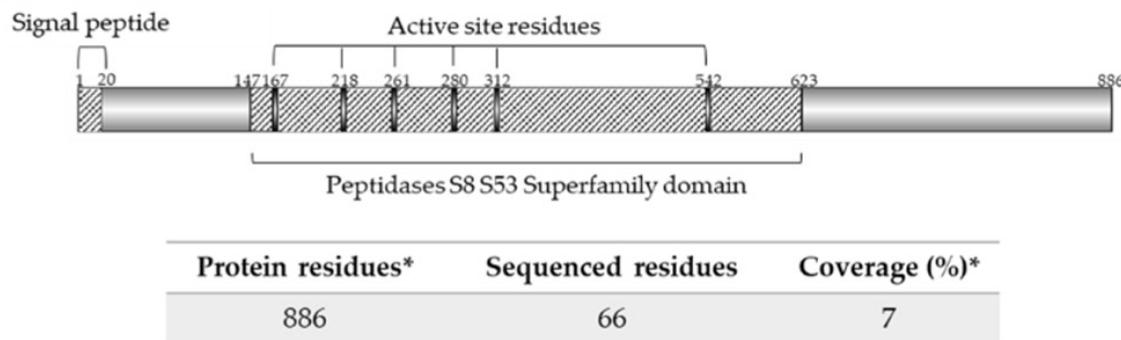
- Domínios relevantes para essas proteínas detectados por meio do banco de dados de domínios conservados do NCBI:
 - Peptídeo sinal (itálico)
 - resíduos do sítio ativo (sublinhado)
 - triade catalítica (vermelho)

Proteases extracelulares identificadas no extrato protéico do sobrenadante de culturas de *Beauveria pseudobassiana*



(a)

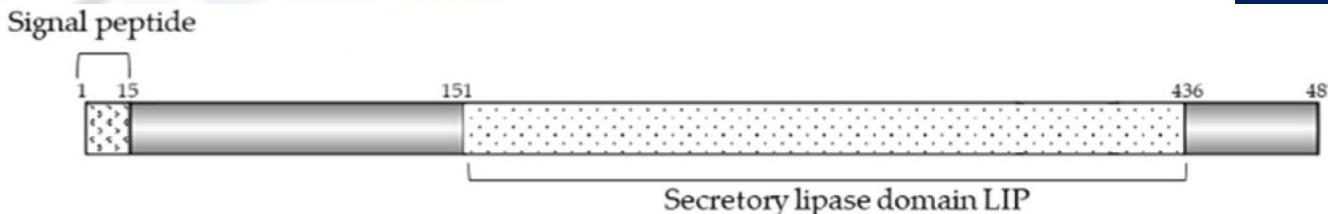
- A e B: Sequências e esquemas das exoproteases P1 (OP328424) e P2 (OP328429)



(b)

Lipases extracelulares identificadas no extrato protéico do sobrenadante de culturas de *Beauveria pseudobassiana*

1 MKFLSLVAAV LPLASALTIP EKRIIITSVND PFYVPPSGLE SVEDSSALT
51 PEKRITTPAN DPFYVPPSGF ESAKPGTVLR ERPIVVSFFG LIPAPIDSQ
101 LLYRTTAIDG SPIATVTTVF KPLFAKRDRF ISFNTAYDSS ASICNPSYN
151 RLGALQTDLI SSAEFLIIQA YLLSGYTVAS ADYEGPDVAF SAGRLSGMGV
201 LDGIRAVVNY SPKIGLDKNP MVVNAGYS_{SGG} AIASGWAASL HPTYAPDLNL
251 KGFIAAGGTPA NLTQVLLYVD GTLFAGFLPG ALAGQIMPSA YGARLKPVLD
301 RVITPRGKEA LALGTSQCAP VNLIAGFKS IFDTSFQTLG KDLLYDKDVA
351 WVLNESTLGL KKNETPTVVPV MLYHSPD_{DEV} IPFAGAESLR KRWC
401 DNGANGNV RFVN_{YAAGGH} VTAEVVAVID ALKFAGDAFS GSVPGGCASR IVLDDKLNPL
451 ALGLSLEPV_L AGLVNILL_{SL} GKKDANWVSG LSQGKQI



Protein residues*	Sequenced residues	Coverage (%)*
487	273	56

(a)

1 MLAKGLLSAA LVVAHALVAS AAPPMHDPR TAPILPSQDP FYSVPDSISA
51 AASGTILRHR KTPSSIAAFA LDSVNLAE TY QLQYRTADNP GNATAAVLTV
101 LVPHHADM SK VLSYQVAEDA ASADCAPS YT LQRGSRPGP FGSLFEQAEI
151 LLIEAVLEQD WVVVVPDYEG PEALYLAWRL AGQATLDGIR AALGSEKITG
201 TAADATVAMW GYSAGSMATA WAAEIQPQYA PELHIAGAAF GGTPNITNV
251 VGATNKGNFA GLLPTGIMGL SNQYPAIKDM VDRLLKPEFR EVVEQTKHQC
301 PFADLAAFSG LDVTAMFTDP RFM_{YNDPVAV} KVLAEIDLQQ AVPEVPIYWY
351 KSVH_DE_VSPV ADSDAVYEWY CAGGATIEYV RDEVSE_HASA MATGAPRAVA
401 WLKNIMDG_GK PKPGCSKETT LSSLLDLSTI EVLPGFILDA LLDLVGKPVG
451 PWLA

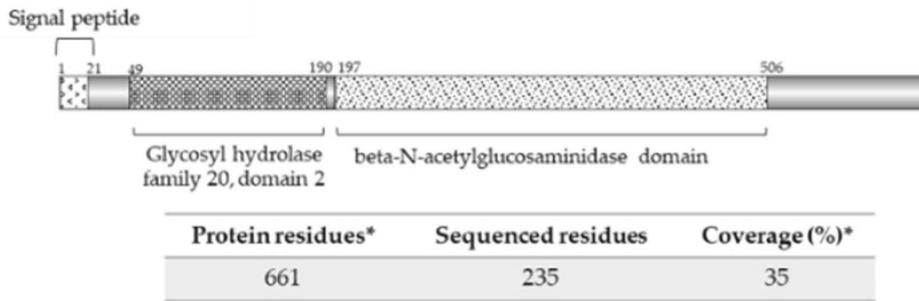


Protein residues*	Sequenced residues	Coverage (%)*
454	74	16,3

(b)

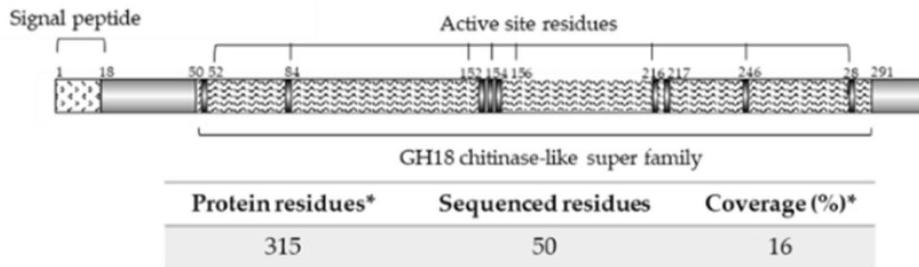
Chitinases extracelulares identificadas no extrato protéico do sobrenadante de culturas de *Beauveria pseudobassiana*

1 MVHLQRVTAL WASFVALSWP VAANPVTTNNN VDAAQIDLKS ASDQKSNVPA
 51 WVPPPQQQISA SSASTVRLNS DVTIVTGNAT DAPTIKAIQA IVADAGGGAT
 101 VSIQASGKGT QIYIGTATQN EAAAAAKAL TGDSAEGLTA EGYVLGSPTY
 151 NGHPTVVNLNG VDIRGTFYAA QTLRQLVNDT PSVPGVKVRD WPLMPIRGSI
 201 EGFYGIWPSH QARKDQYVFY GQHKMNTXVY TPKGDPYLRA TWRELYGGKD
 251 LDQLKDLIET ANANHVDFTY ALSPGLDLCY TSDADFNATV SKFEQLRKLC
 301 VSSFYIQLDD IPLKFHDSD KKFFPDNGDW HWIADAQTYY LNRVQKEYIK
 351 AHHGLTDLET VPTNYAGSAP DPYKGEGFKQ PDKNIRVQWT GEGVFPSDKit
 401 VESVVRADST YVTDKLFIW NFPVNDGKPF RLFLNPLTER APDLYKHMIG
 451 FTSNPMVQSY ASMIALGNYG DYSWNNSPSYD AKKSWAAVIQ ALAGKDKSVH
 501 TALATFVDIN QNWPFYRKSTE SAPQLSKDID NFWAARKSHK NQSSSALTDR
 551 LKLIAASLEDV LPGMAMKPFA TEVAPWSTVA MQWAKASQHM TAMLAADNG
 601 DKSKADDEYK AAQEWEVKTK AKTVDSLSSA GKVVVPNSITP TTGDGVFDaf
 651 IVNATAIYKG Q



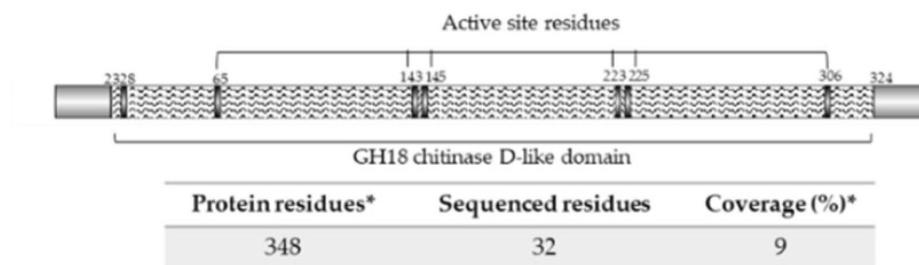
(a)

1 MKLSILSFIT LGVASVMAGS ASVCPSDNTH TTGAALQNIW DYKKGDHQLM
 51 AGYFRSWRDK ASSTANKVSM LDLPDCLDIA FVFPENPEA AFWALKDTY
 101 VPALRKRGTK VVRSGVIAQL INSTWANTPA GWQGLADALL KNVDDYGI DG
 151 LDIDVE QNLIS AAQLQQATGV FNALSKKLGP KSGTGKLLIF DTNMDGSQPL
 201 WRNVYSTISY VLIQSYGRSP SGLQNTYNSF KSYISSKQYL IGFSSFYEEENG
 251 ADWEDTTTPPI TSSRAWQYAK WQPSGATKGG IFSYAIARDG VAIGDDKLQP
 301 TDFTWTRKLI SAMNP



(b)

1 MVSASPLAPR ADTCATKGRP AGKVLQGYWE NWDGAKNGVH PPPGWTPIQS
 51 PDIRKHGYNV INAAFFIIQP DGTALWEDGM DTGKVVASPA DMCEAKAAGA
 101 TILSIGGT AAIDLSSAV ADKFVSTIVP ILEKYNE DGI DIDIE SGLTG
 151 SGNIATLSTS QTNLIRIIDG VLAQMPNSFG LTMAPETAYV TGGSVTYGSI
 201 WGSYLPVIKK YLDNGLRWL NMQYNGEMY GCSGDSYKAG TVEGFVAQTD
 251 CLNKGLTIQG VTIKIPMRSK CLAFLPSLGL VAVTCPRTW RRFSHYKGAL
 301 KGLMTWSLNW DGSKNWTFGD NVKGILGDCV KLEYVRAPO SHGWNWT



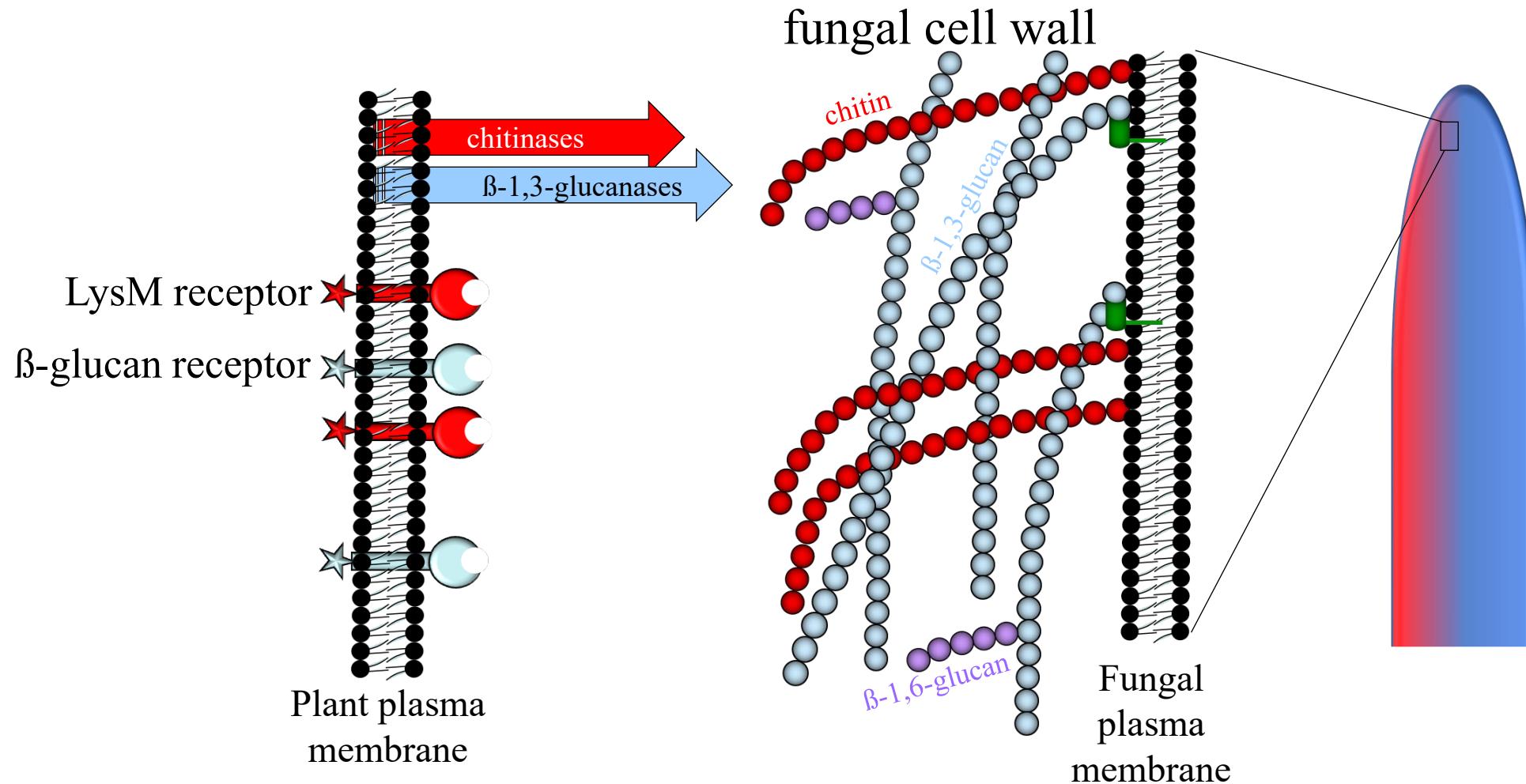
(c)

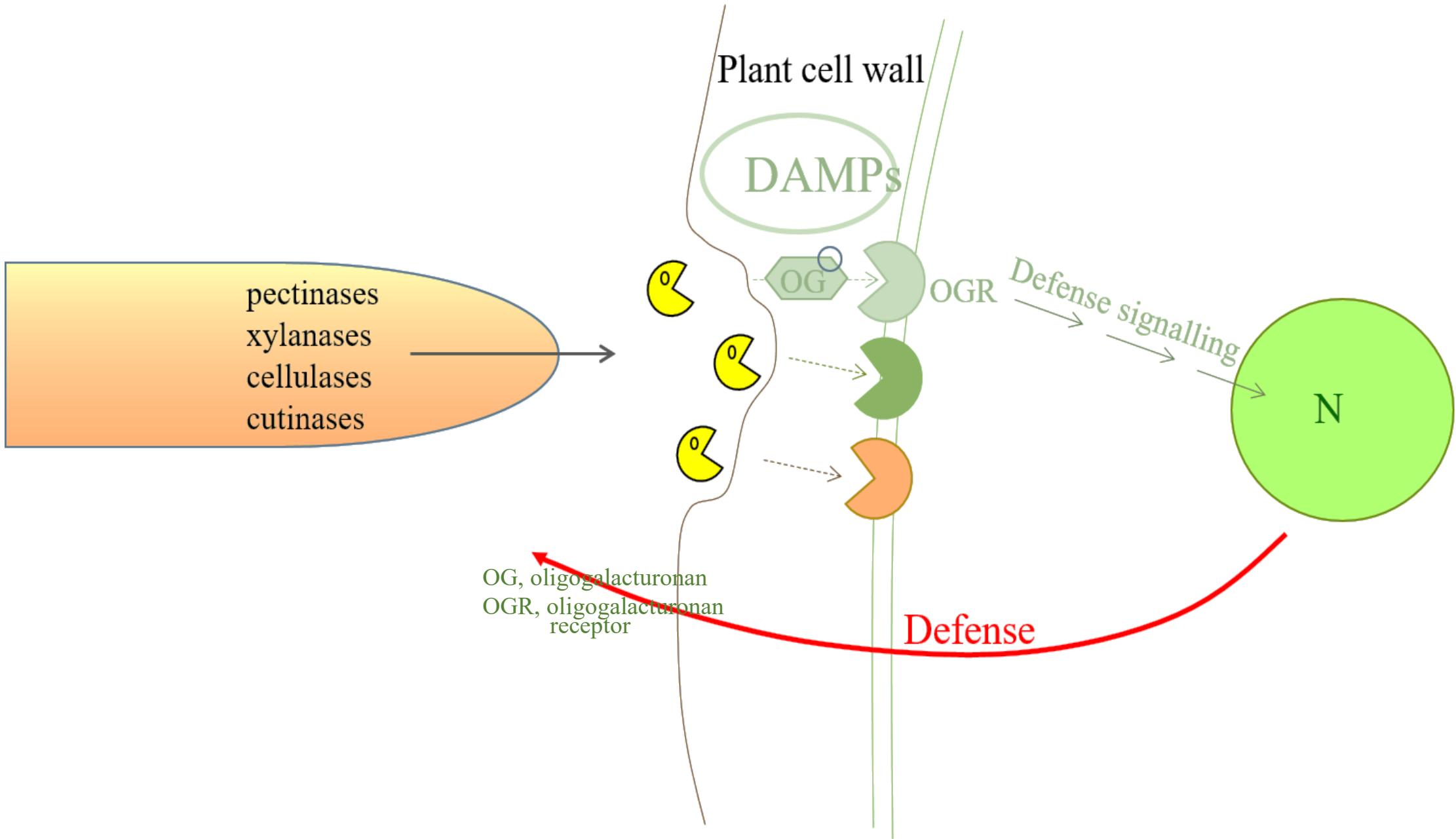
Efetores

Efetores

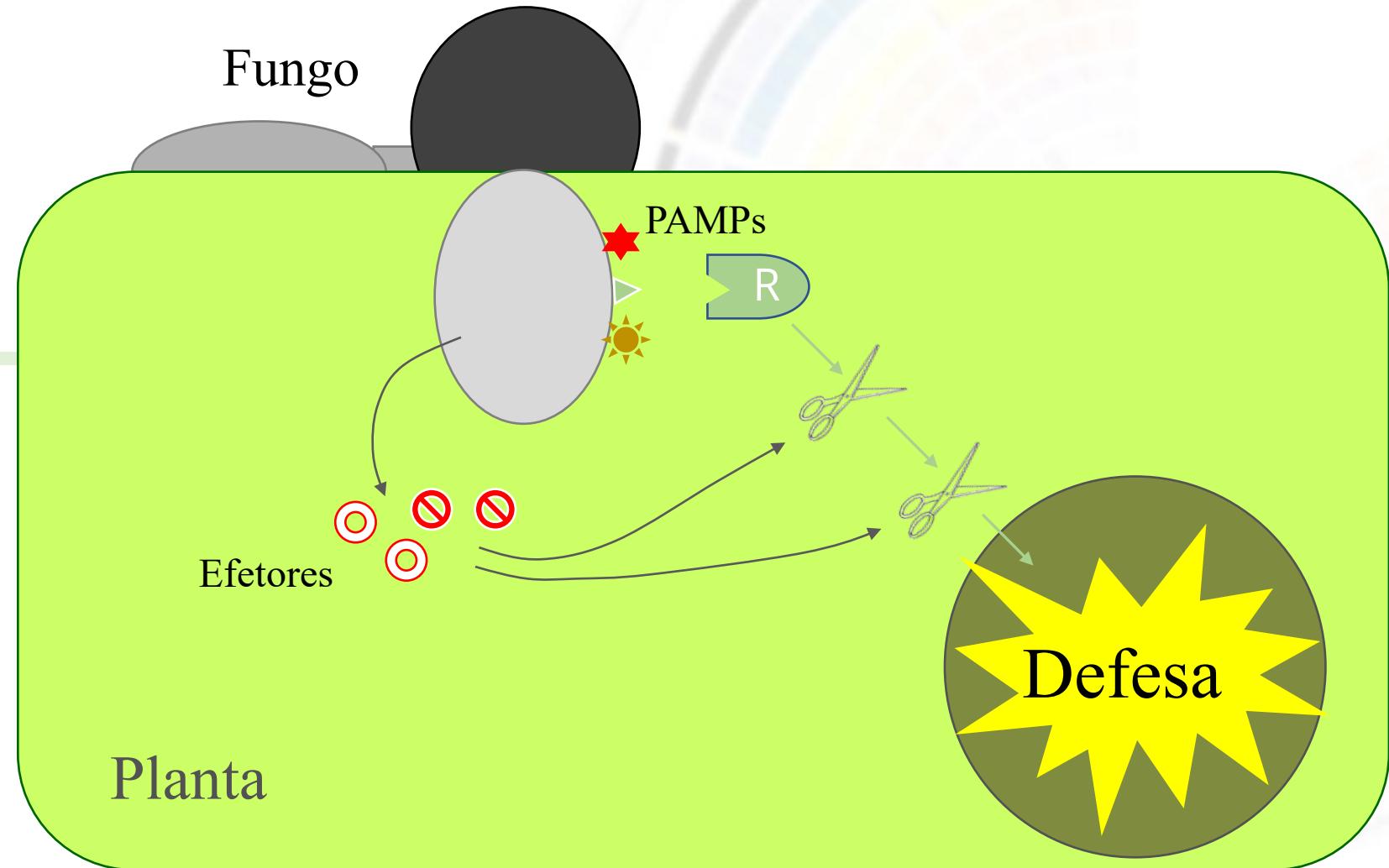
- Pequenas proteínas secretadas (<300aa), muitas vezes ricas em cisteína, que interferem na função de células hospedeiras – auxiliam o patógeno a escapar da defesa do hospedeiro
 - Além de efetores proteicos, hoje são conhecidos os efetores não proteicos (metabolismo secundário, Collemare et al. 2019)
- Fundamentais para a virulência dos patógenos
 - Modulam ou permitir a interação p-h
 - Muitas interagem com proteínas dos hospedeiros
- Altamente variáveis, rápida evolução acompanhando o rápido surgimento de defesa dos hospedeiros
- Muitos participam na adaptação e no salto do patógeno para novos hospedeiros – podem contribuir para a especiação

A exposição da superfície de β -1,3-glucan é arriscada durante a patogênese - conceito de imunidade desencadeada por PAMP



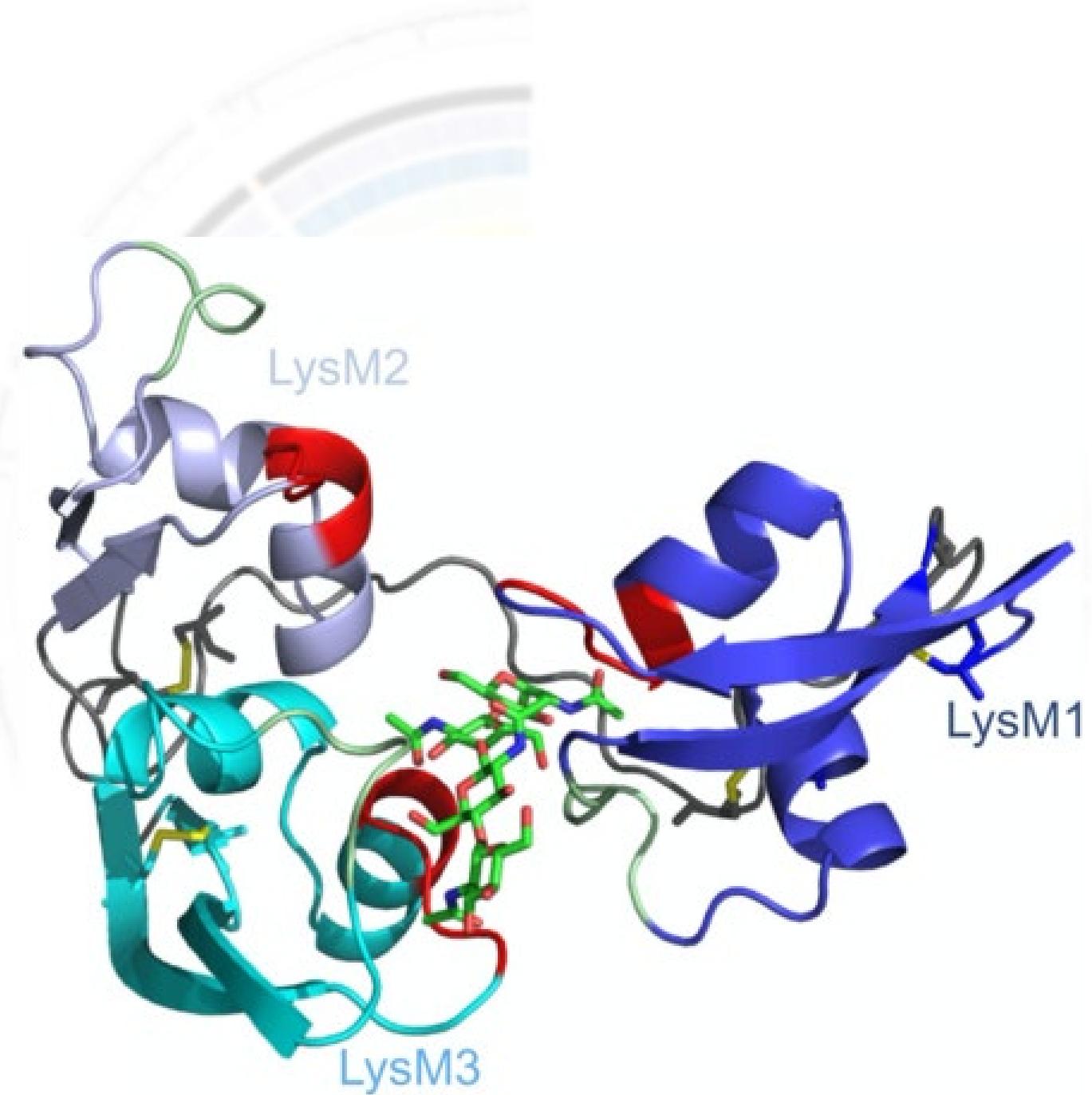


Os efetores ajudam a estabelecer uma interação parasitária compatível, apesar da presença de PAMPs ou DAMPs



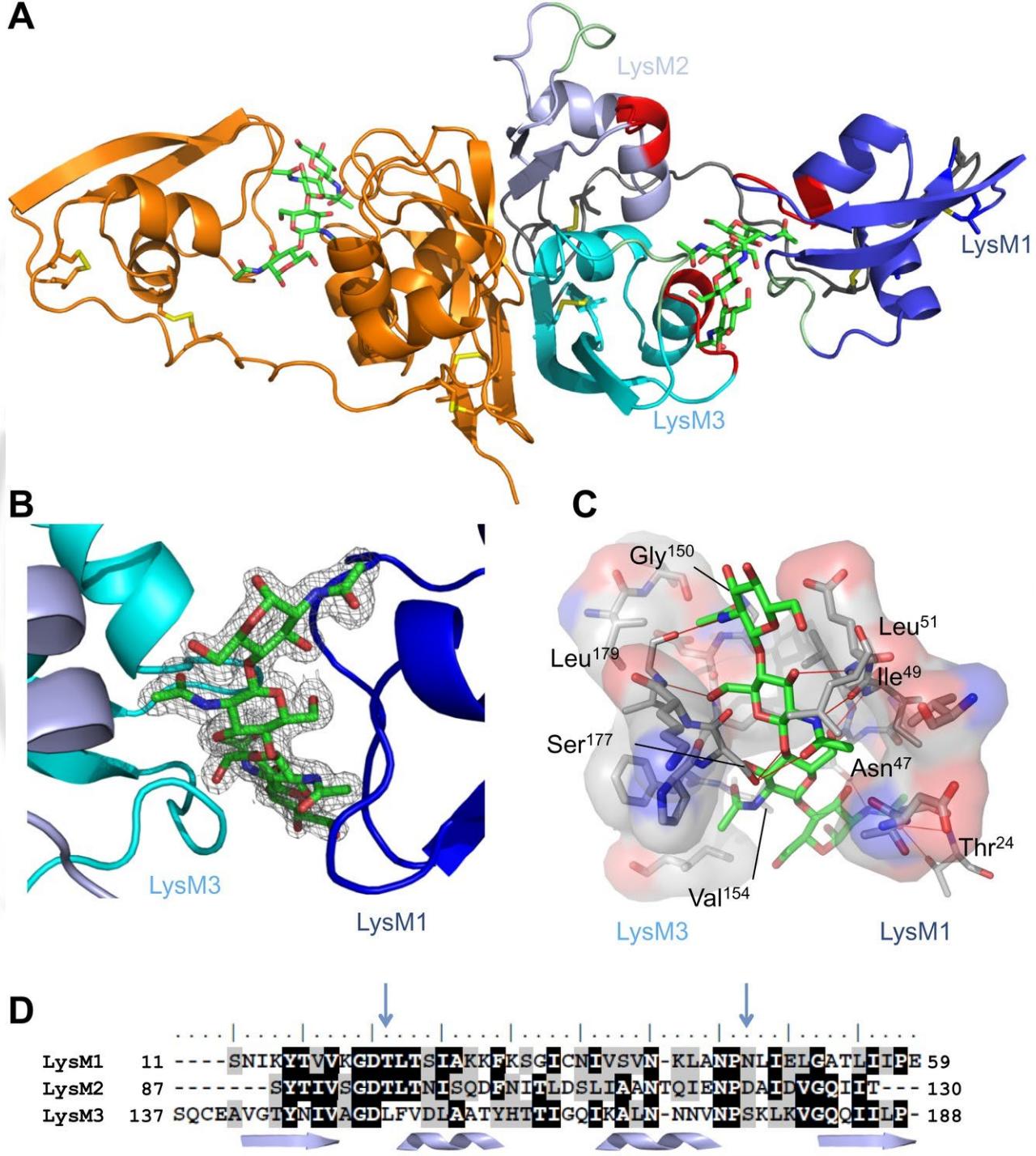
Modelo de estrutura cristalina de um monômero do efetor *Cladosporium fulvum* LysM Ecp6 com os três LysMs em três tons de azul com os loops de ligação à quitina mostrados em vermelho

Um tetrâmero de quitina (bastões verdes) está fortemente ligado entre LysM1 e LysM3



Estrutura cristalina do efetor *Cladosporium fulvum* LysM Ecp6

(D) Alinhamento Clustal-W dos três domínios LysM de Ecp6. A distribuição das α -hélices (hélices) e β -folhas (setas) são mostradas. Os dois locais de ligação à quitina em LysM1 e LysM3 são indicados com uma linha vermelha para o primeiro loop entre a primeira folha β e a primeira α -hélice e uma linha verde para o segundo loop entre a segunda α -hélice e a segunda folha β , conforme indicado no monômero



A hipótese gene a gene de Harold Flor

Cultivares de culturas específicas (CVs) são capazes de se defender contra raças específicas de patógenos
Exemplos: Enquanto o ataque de raças específicas do fungo ódio da cevada *Blumeria graminis* f. sp.
hordei e de raças específicas do fungo da ferrugem do linho *Melampsora lini* são reconhecidas por CVs
específicos de cevada e linho, não são reconhecidas por outros CVs. A partir de 1940, Harold Flor usou o
sistema linho-ferrugem do linho para descrever a base molecular do reconhecimento de patógenos
específicos da raça (linhagem)



Dr. Harold H. Flor

Flor, 1971: Annu Rev Phytopathol 9, 275-296

Para cada gene que condiciona a resistência no hospedeiro existe um gene correspondente no parasita que condiciona a patogenicidade

Modelos genético e bioquímico para a hipótese gene a gene de Flor

Percepção de elicidores específicos de raça (efetores) por receptores específicos de raça

Genetic model

Fungus	Resistance gene Avirulence gene	Plant	
		<i>R</i>	<i>r</i>
	<i>Avr</i>	Resistance	Disease
	<i>avr</i>	Disease	Disease

Biochemical model

Plant: R protein

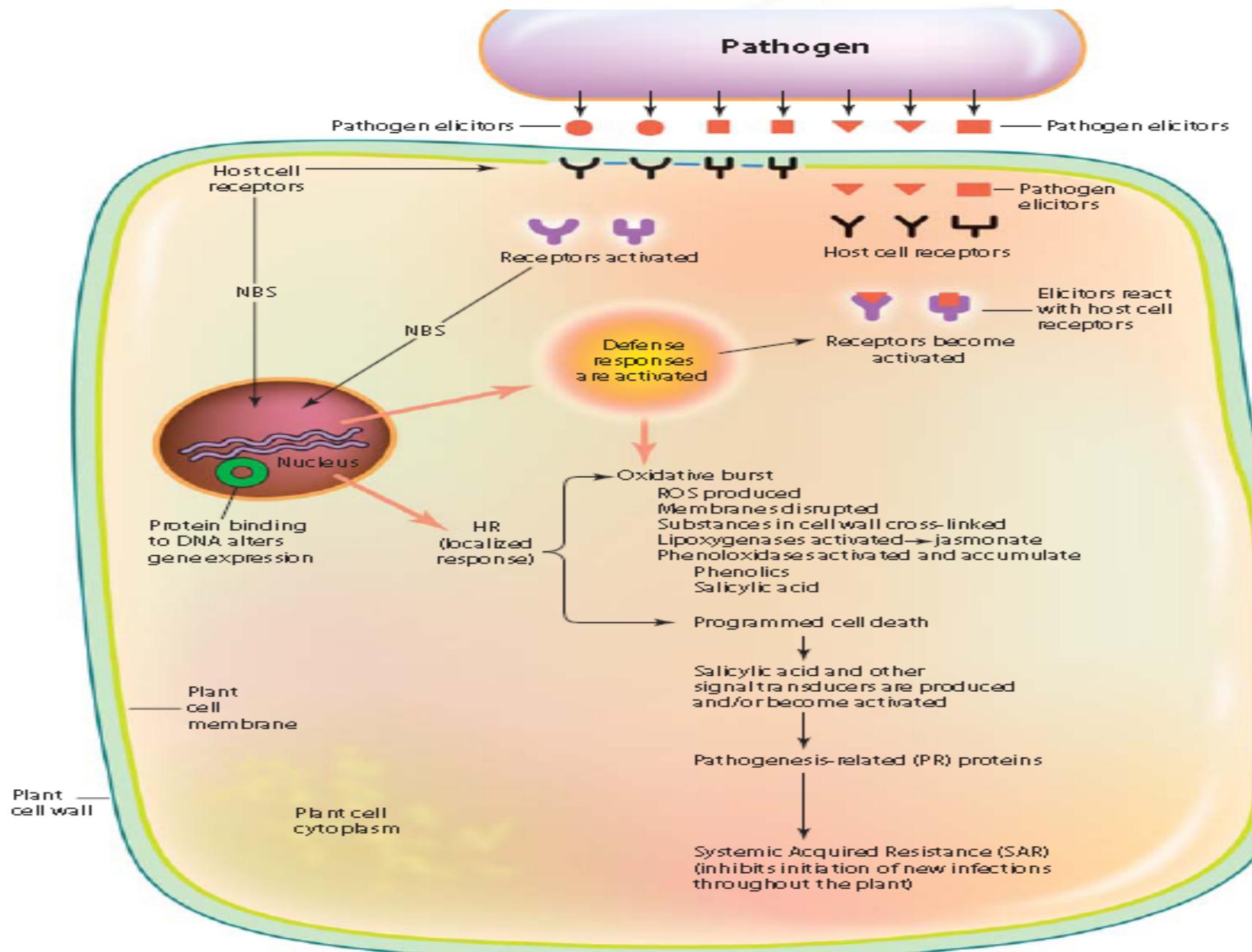


Resistance (HR)	Disease (no HR)
Disease (no HR)	Disease (no HR)

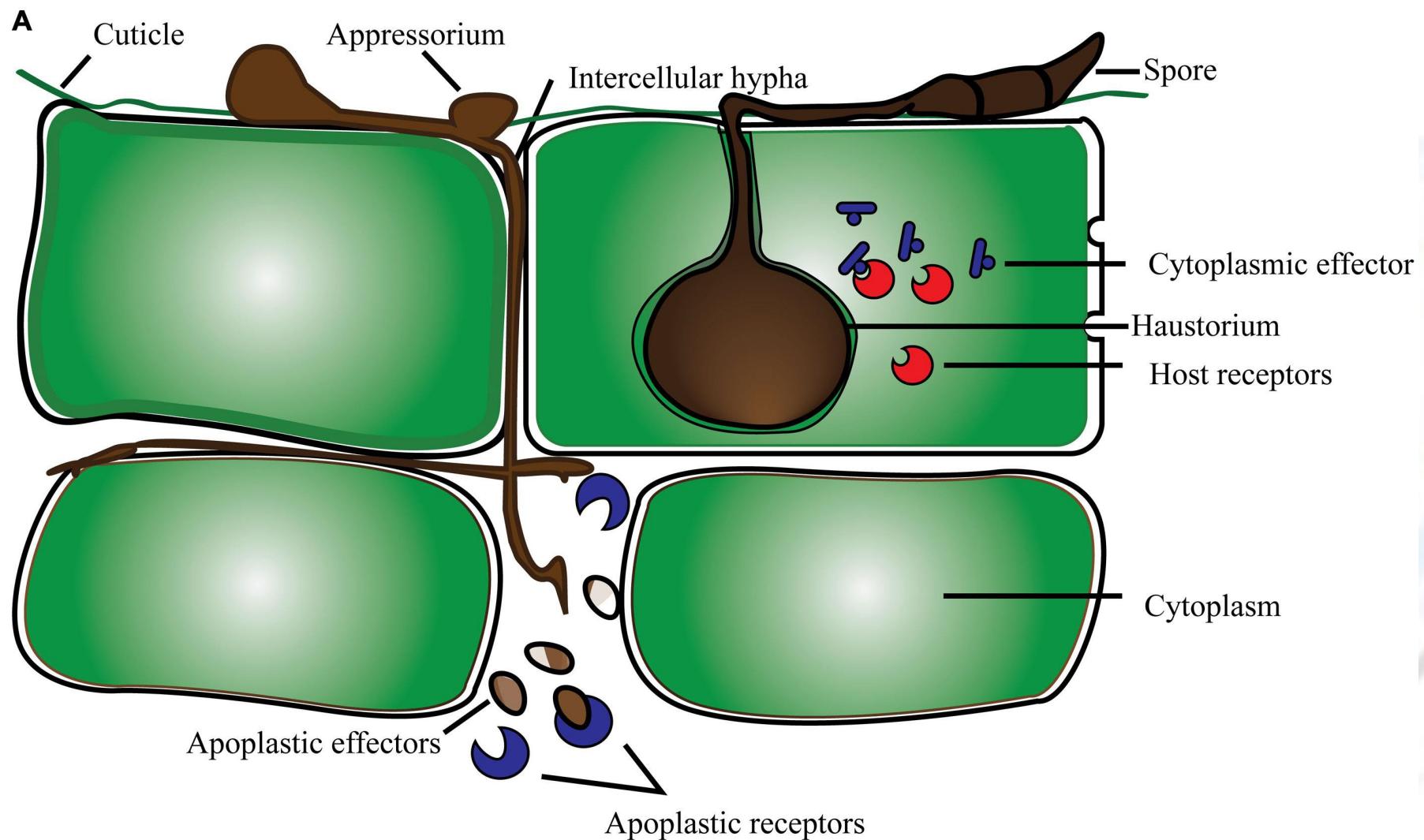
Fungus: Avr protein



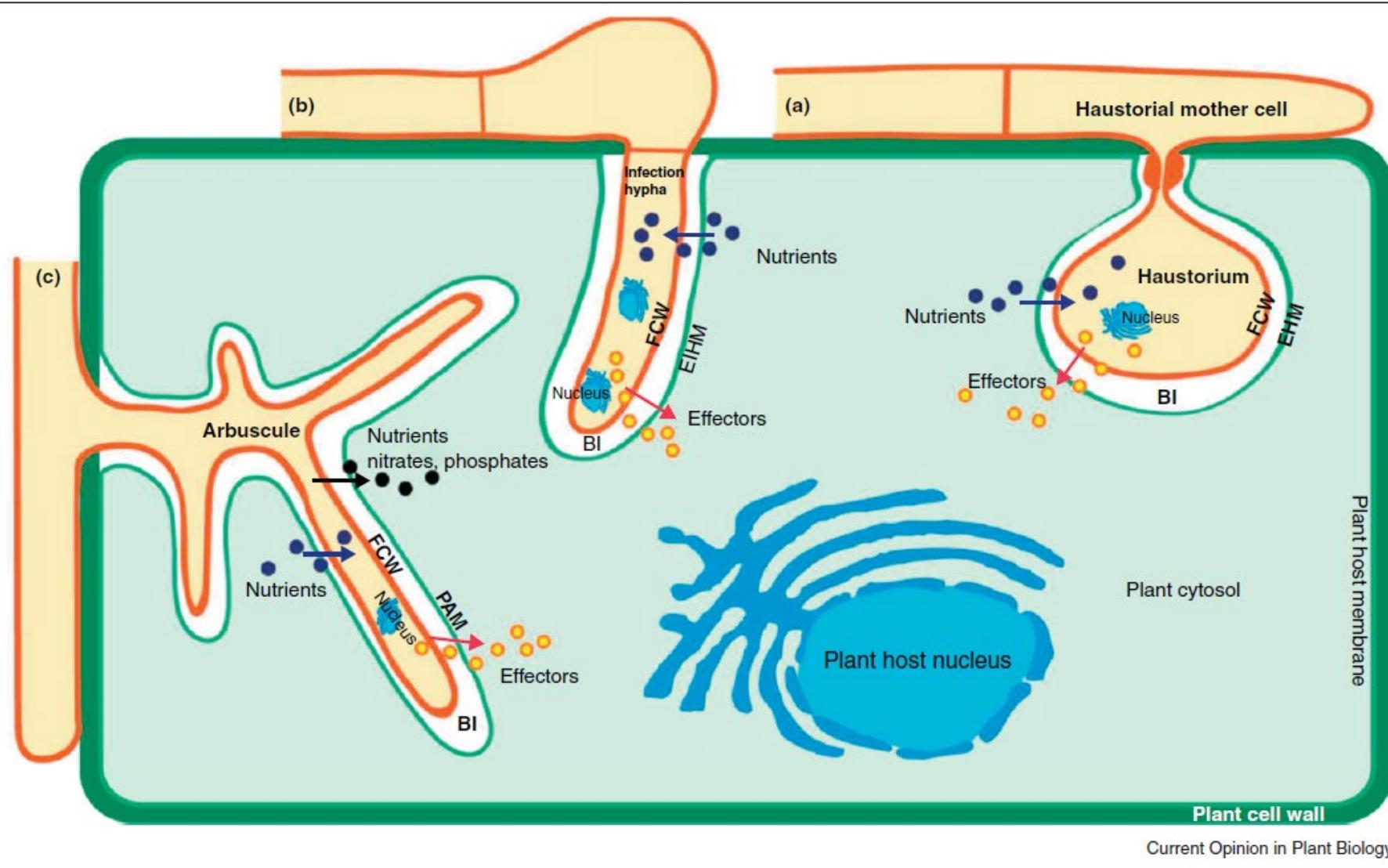
Genes efetores como genes de avirulência



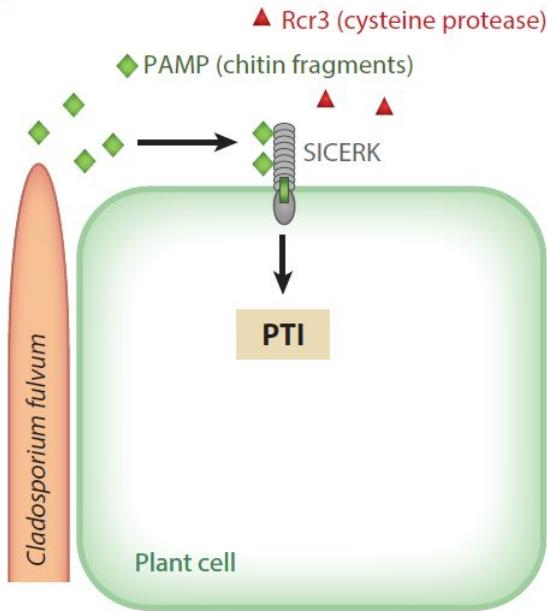
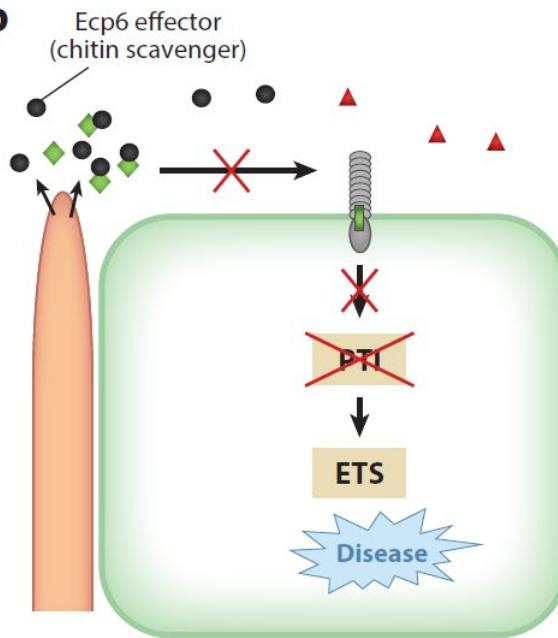
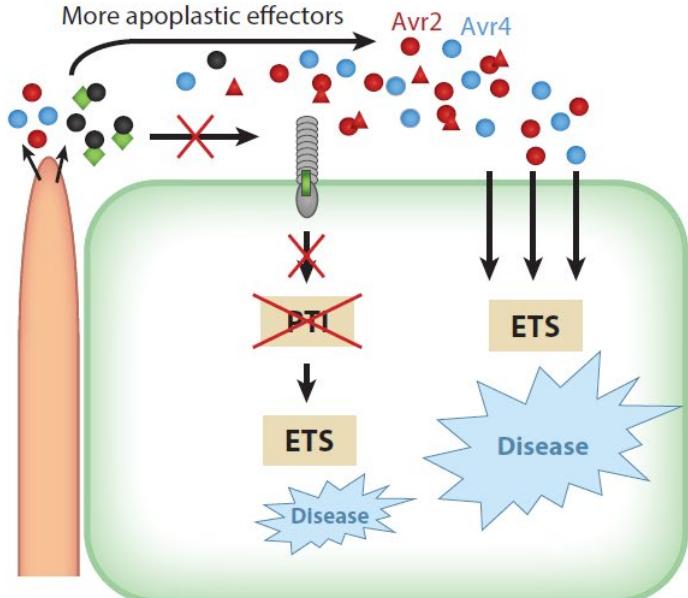
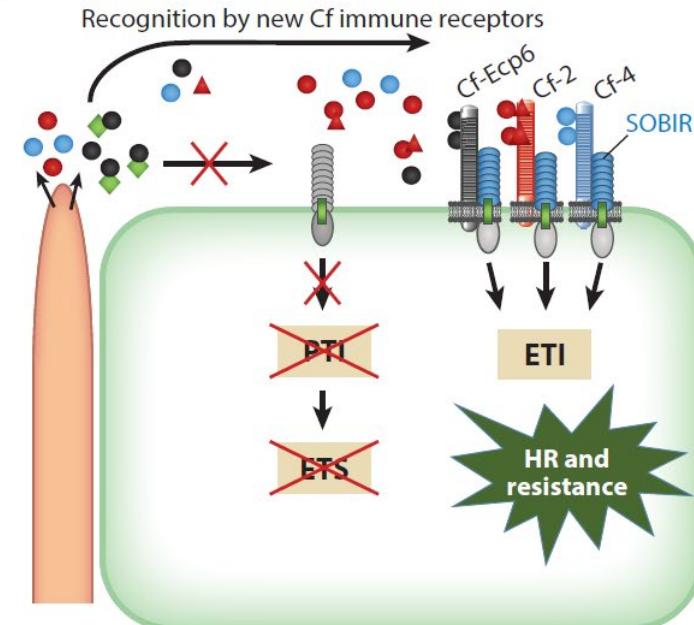
Efetores secretados por fungos e oomicetos no citoplasma ou na região apoplástica da célula vegetal



Estruturas especializadas de infecção para secreção de efetores por fungos biotróficos



- A. Haustoria-forming fungal pathogens
- B. non haustoria-forming fungal pathogens
- C. arbuscular mycorrhiza

a**b****c****d**

1. An evolutionary scenario of the arms race between *Cladosporium fulvum* and tomato. (a) Chitin fragments from *C. fulvum* are recognized by chitin receptor–inducing PAMP (pathogen-associated molecular pattern)-triggered immunity (PTI).
2. (b) *C. fulvum* secretes the Ecp6 effector that scavenges chitin fragments to prevent PTI, leading to a weak form of effector-triggered susceptibility (ETS).
3. (c) *C. fulvum* secretes additional effectors (Avr2) targeting apoplastic host targets (cysteine protease Rcr3) and Avr4 (protecting against plant chitinases) to increase virulence.
4. (d) Tomato develops new Cf immune receptors to recognize new effectors to induce effector-triggered immunity (ETI).

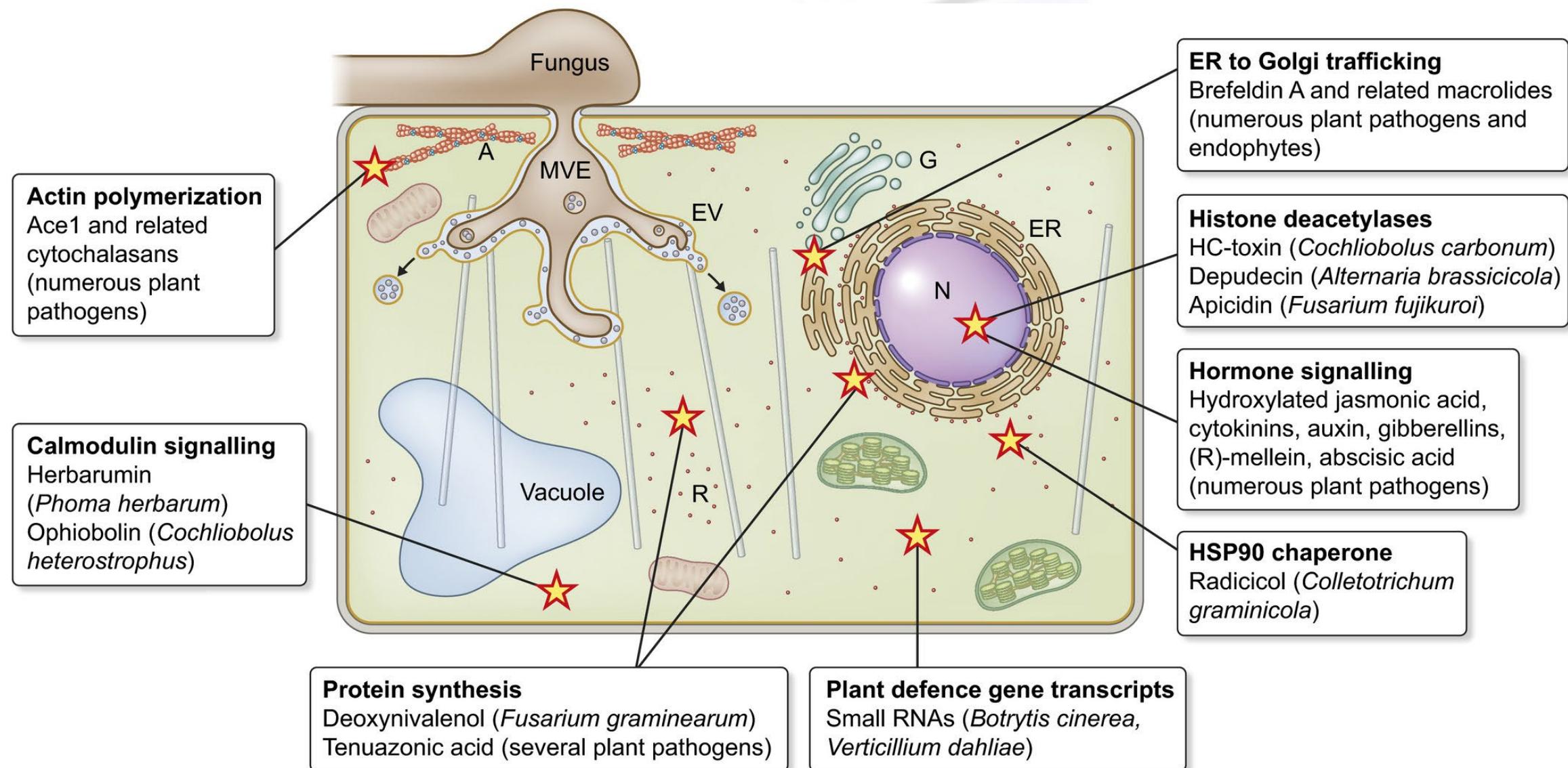
Efetores

- Alguns são espécie específicos, outros conservados (em espécies colonizando mesmos hospedeiros ou compartilhando lifestyle (modo de interação patógeno-hospedeiro))
- Em algumas espécies estão organizados em clusters no genoma
- Em outras espécies encontram-se dispersos no genoma – associação com elementos repetitivos
- Associação com elementos transponíveis

Evolução de efetores

- Surgimento de clusters:
 - Amplificação gênica (*in tandem*) seguida por rápida diversificação
- Associação de clusters com elementos transponíveis (ETs):
 - Efetores e ETs localizados em locais específicos do genoma
 - Compartimentalização de genomas
 - Rápida evolução
- Importância dos clusters para estudo da interação p-h
 - Estudo funcional de efetores: deleção de clusters:
 - linhagens menos virulentas
 - Pouco efeito em deleções individuais

Efetores não proteináceos: a terra incógnita das interações planta-fúngico



Gene clusters associados ao metabolismo secundário

Biosynthetic Gene Clusters (BGCs)

Metabólitos secundários

- compostos bioativos especializados produzidos principalmente por plantas, fungos e bactérias
- fonte vital para a descoberta de medicamentos: de medicamentos anticancerígenos, antivirais e redutores de colesterol a antibióticos e imunossupressores
- genes envolvidos na biossíntese de muitos SMs em fungos:
 - co-localizados no genoma - organizados como clusters de genes (clusters de genes biossintéticos - BGCs)
- geralmente compostos por:
 - um ou mais genes de sintase ou sintetase que codificam enzimas principais - produzem a estrutura central do composto - determinam a classe de SM produzida por um BGC
 - genes que codificam enzimas tailoring (de “adaptação”) - modificam o composto principal para gerar variantes
 - Genes adicionais que codificam:
 - fatores de transcrição específicos
 - Atenuadores de toxicidade
 - Transportadores

Metabólitos secundários

- Pequenas moléculas bioativas
 - Toxinas (ex: aflatoxin em *Aspergillus* spp. trichothecene em *Fusarium* spp., estrobilurinas em *Strobilurus tenacellus*)
 - Antibióticos (ex: streptomicina - *Streptomyces*)
 - Outros:
 - imunossupressor (ciclosporina)
 - anticoletolêmico (pravastatina),
 - anticâncer (taxol)
 - corante (monascorubrina)

Metabólitos secundários

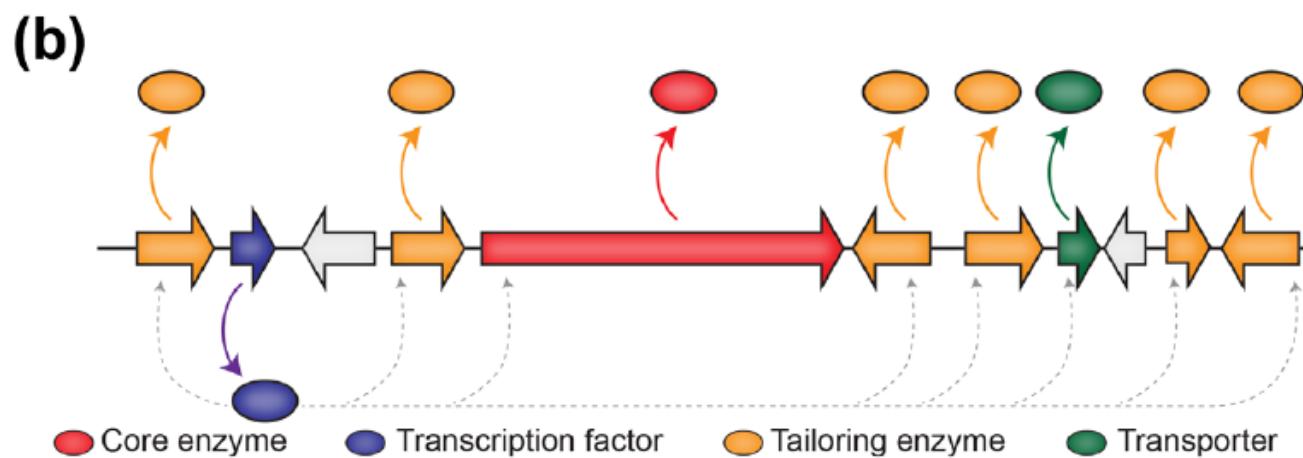
- Pequenas moléculas bioativas
 - toxinas
 - Antibióticos
- Desempenham outros papéis
 - fatores de avirulência
 - supressores da defesa do hospedeiro
 - aumentam a rigidez das paredes celulares dos fungos
- Atuam em
 - Defesa
 - Aquisição de nutrientes
 - Interações - mutualismo

Identificação de novos BGCs

- descoberta de novos compostos que podem servir como fonte vital para a descoberta de medicamentos
- disponibilidade de um grande volume de dados de genomas fúngicos
- descoberta é uma tarefa desafiadora:
 - diversidade de BGCs fúngicos
 - diferenças notáveis na sintenia
 - não conservação de sequências, mesmo em espécies relacionadas ou diferentes linhagens da mesma espécie

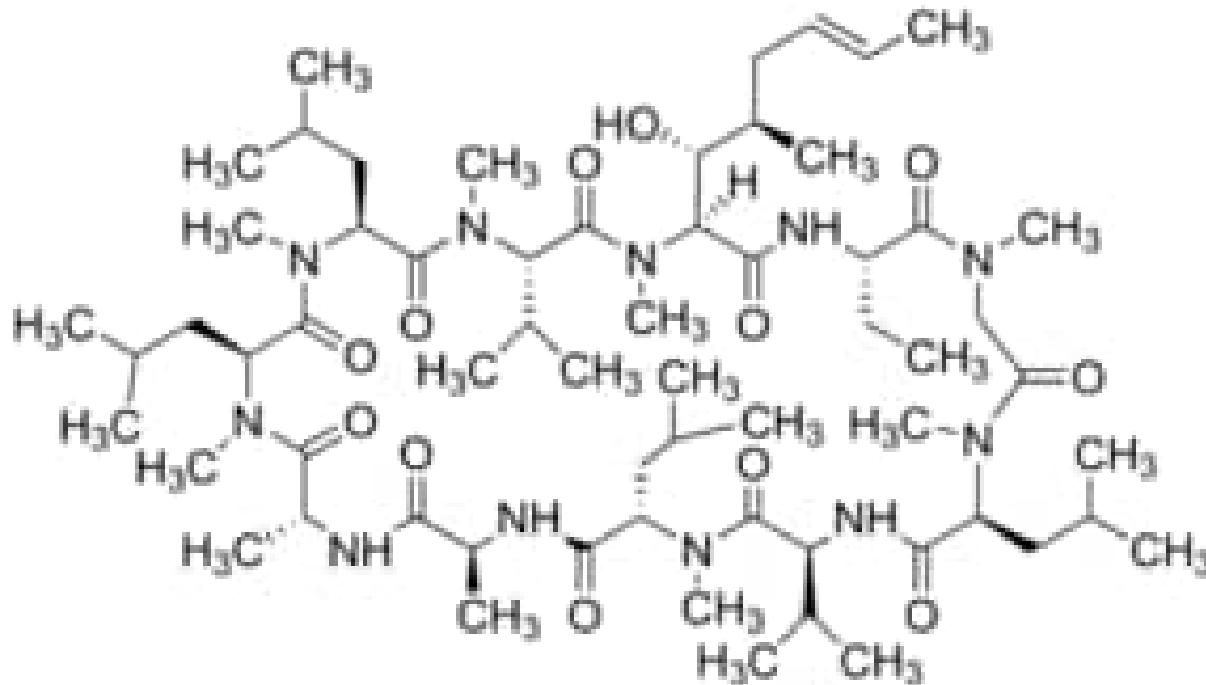
Metabólitos secundários

- geralmente sintetizados a partir de apenas alguns precursores originários do metabolismo primário por meio de vias bioquímicas
- Principais classes de genes principais “core”
 - policetídeosintases (PKSs) - policetídeos
 - peptídeos sintetasas não ribossomais (NRPSs) - peptídeos não ribossomais
 - dimetilalil triptofano sintases (DMATs)- indol alcalóides
 - terpeno ciclases (TCs) – terpenos

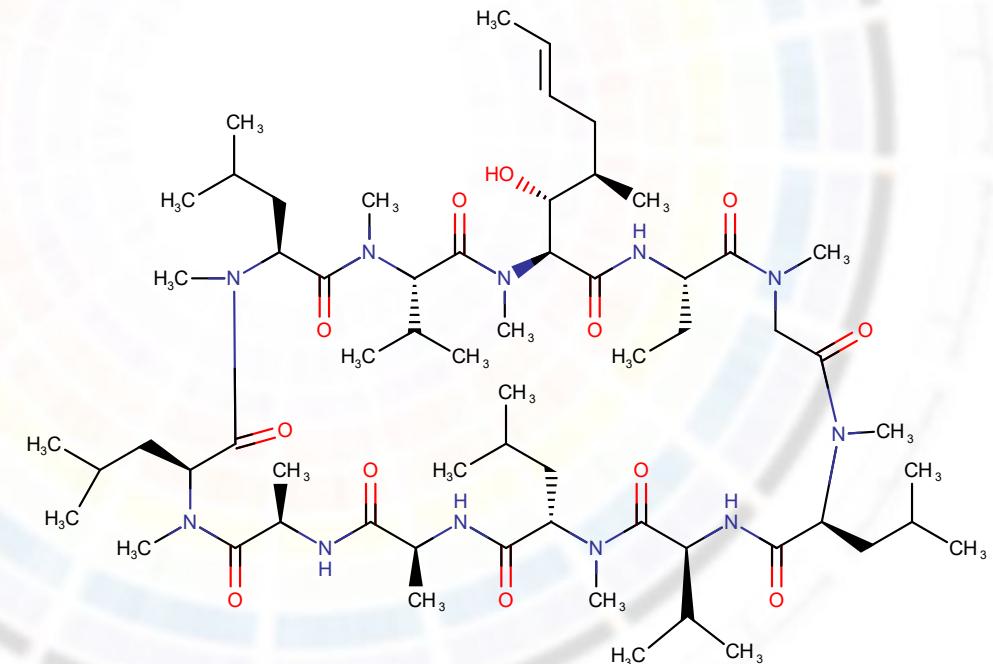


Peptídeos Não Ribossomais

- Maior classe de SMs já caracterizados em fungos
- Os NRPs mais famosos encontrados em fungos:
 - antibióticos β -lactâmicos - penicilina e cefalosporinas



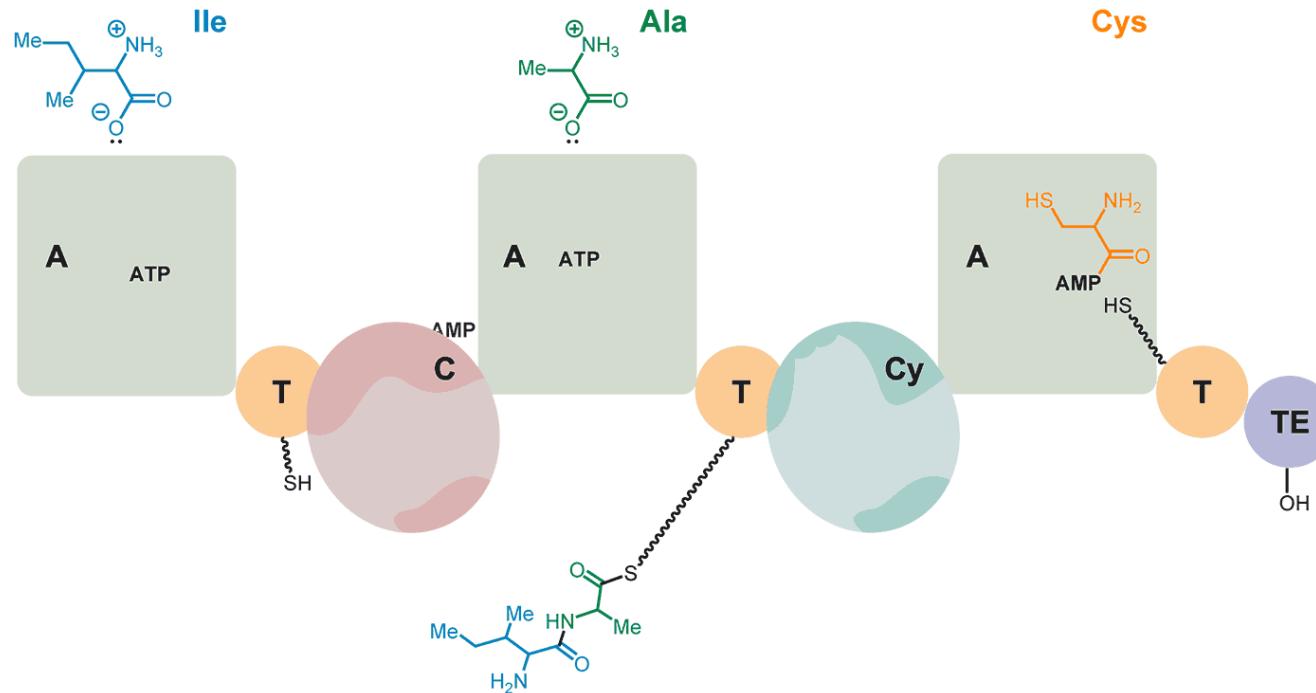
Cyclosporin A – antibiótico produzido pelo fungo
Tolypocladium inflatum



Cyclosporin Imunossupressor – transplantes –
produzido pelo fungo *Beauveria nivea*

Estrutura/organição das enzimas principais (“core enzymes”)

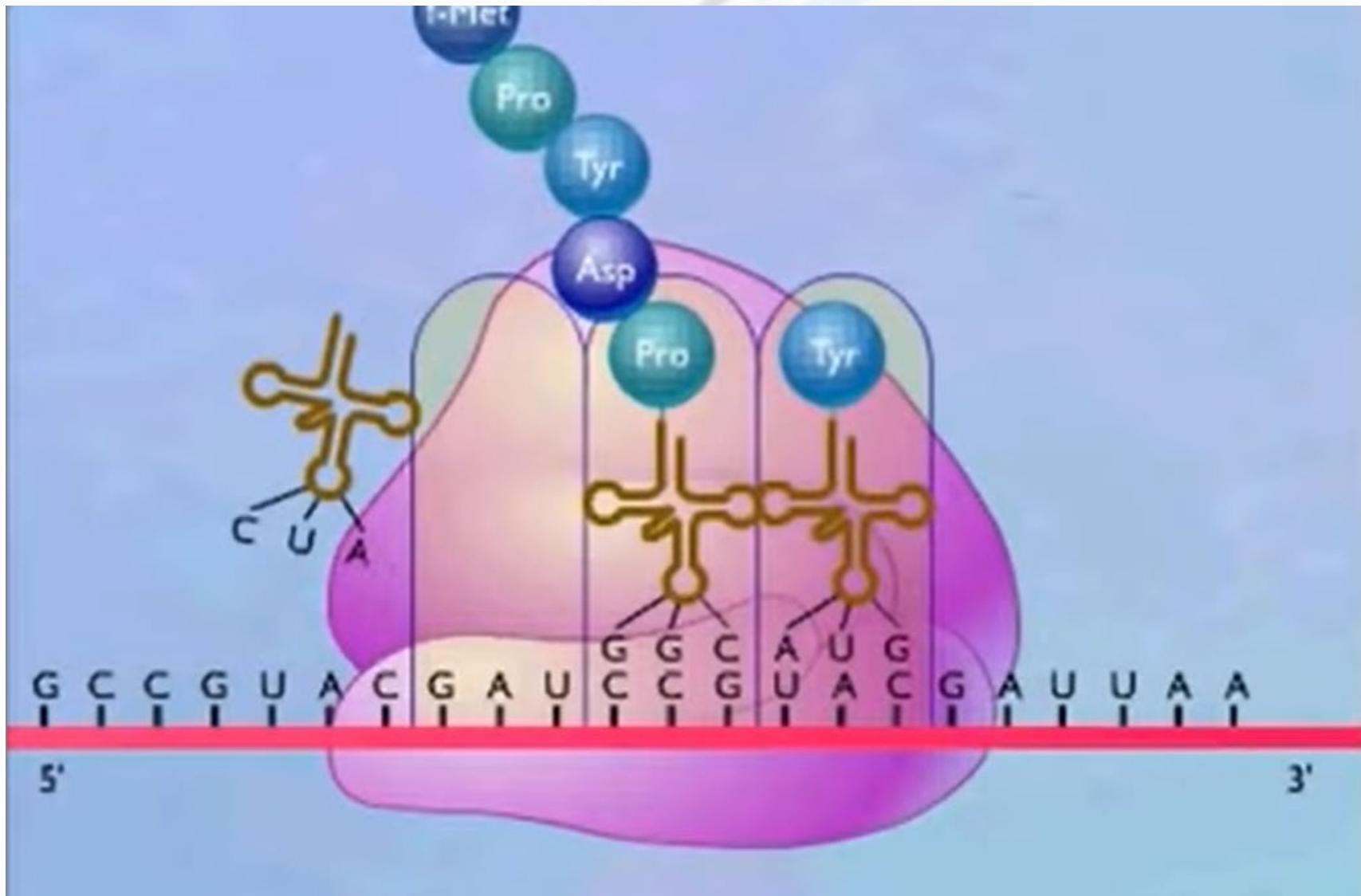
Nonribosomal peptide biosynthesis



2020 Michael W. Mullowney | @MWMullowney | MichaelMullowney.com

http://www.michaelmullowney.com/images/NRPS-animation-Mullowney_16-9_0.08.gif

Síntese proteica ribosomal



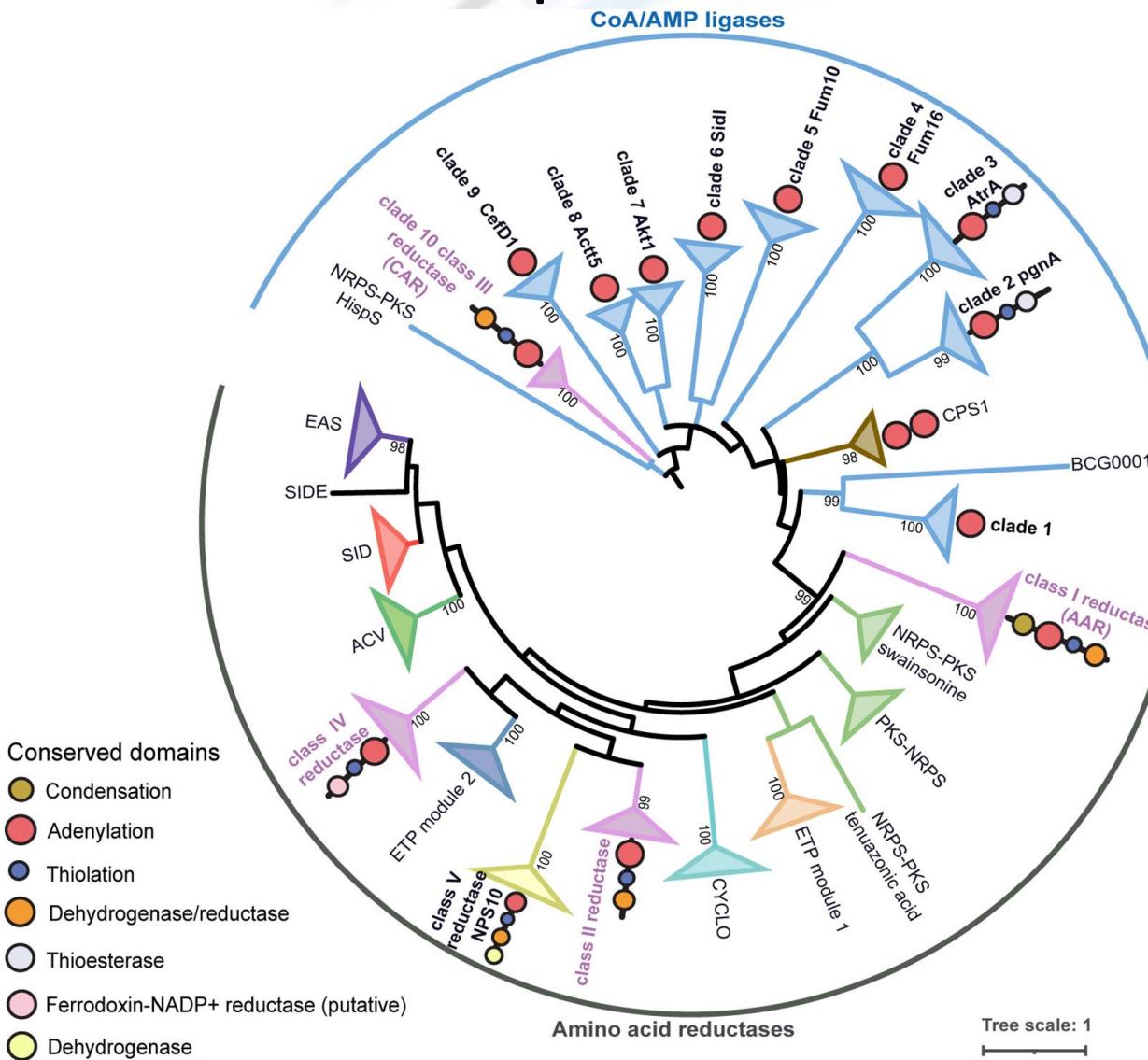
Peptídeos sintetasas não ribossomais (NRPSs)

- megaenzimas caracterizadas por uma organização modular
- cada módulo consiste em três domínios conservados:
 - domínio de adenilação (A) que ativa e carrega um aminoácido selecionado em um domínio de tiolação (T)
 - domínio de tiolação (T) (também conhecido como proteína transportadora de peptidil)
 - domínio de condensação (C) que catalisa a ligação peptídica entre dois aminoácidos ligados em dois módulos diferentes
- em fungos:
 - NRPSs são compostos de um ou vários módulos
 - classificados como NRPSs tipo I

Peptídeos sintetasas não ribossomais (NRPSs) - like

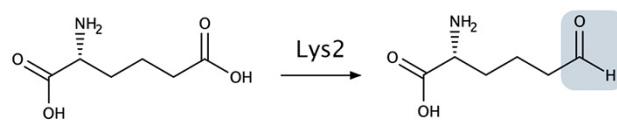
- forma semelhante aos NRPSs:
 - abrigam um único módulo com os domínios A e T, mas não possuem o domínio C
 - subgrupo dessas enzimas termina com um domínio redutase/desidrogenase (R) ou tioesterase (TE) que libera o produto final da enzima
- enzimas não canônicas: NRPSs tipo III
- difere das NRPS em sua lógica biossintética:
 - substratos montados não se restringem a aminoácidos, mas também incluem aril-ácidos/ α -cetoácidos lineares ou aromáticos
 - produzem uma ampla diversidade de moléculas que não se restringem a peptídeos não ribossômicos

Filogenia de domínios de adenilação fúngica (A) de sintetases de NRPSs tipo I e NRPS-like

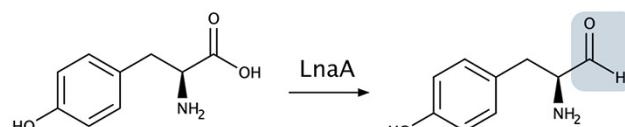


Atividades enzimáticas de enzimas NRPS-like fúngicas

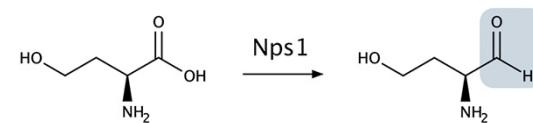
Class I reductase



Class II reductase



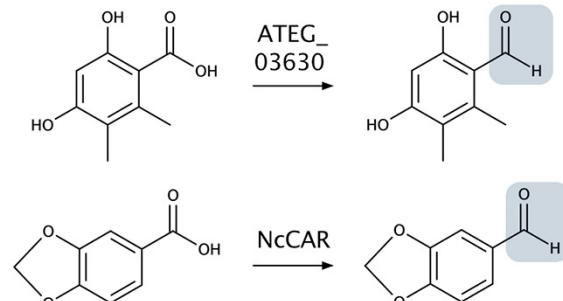
Class IV reductase



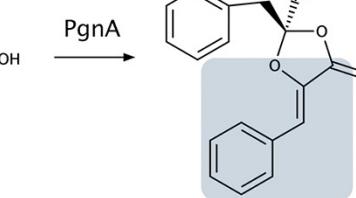
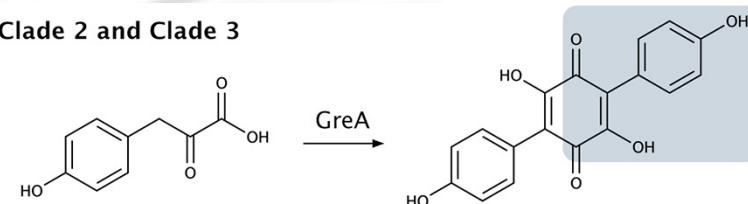
NPS10 / Class V reductase



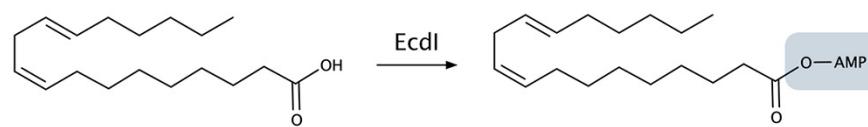
Clade 10 / Class III reductase



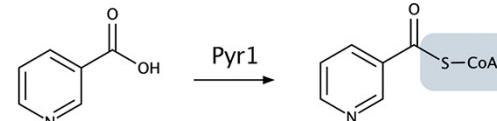
Clade 2 and Clade 3



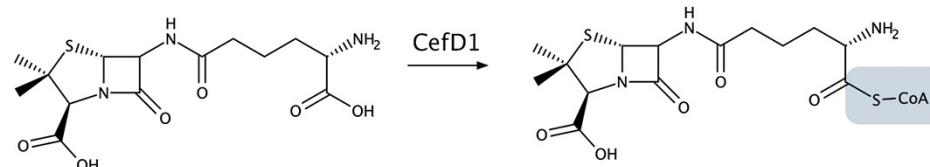
Clade 7



Clade 8

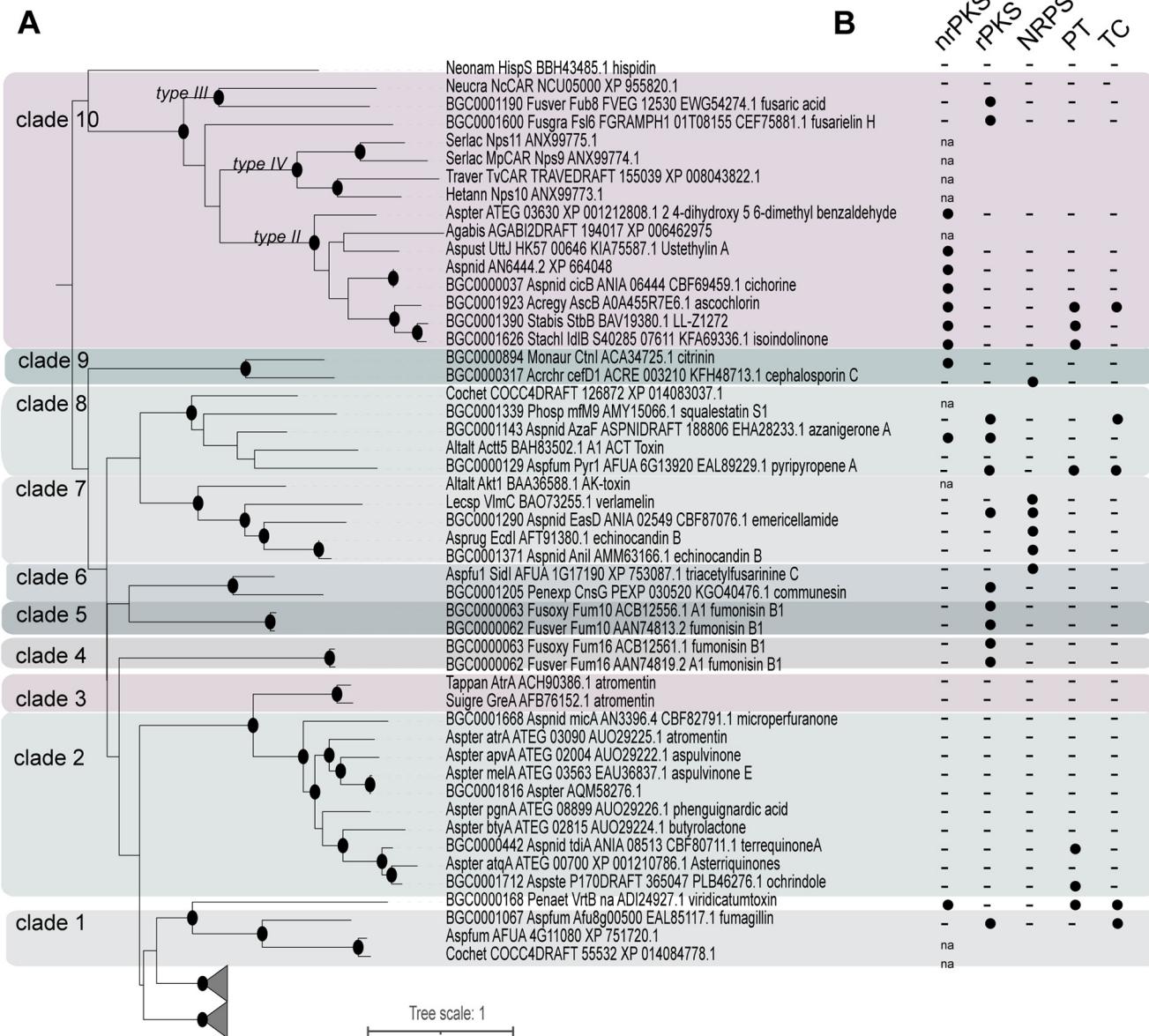


Clade 9



Colocalização de genes NRPS-like fúngicos e genes principais (core)

- (A) Árvore filogenética de máxima verossimilhança de domínios de adenilação (A) fúngica
- (B) Outras enzimas biossintéticas codificadas em loci de genes NRPS-like
- Traços indicam que nenhum gene principal foi encontrado
- nrPKS: non-reducing polyketide synthase;
- rPKS: reducing polyketide synthase;
- NRPS: non-ribosomal peptide synthetase;
- PT: polyprenyltransferase;
- TC: terpene cyclase

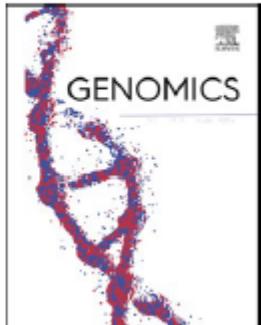




Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Genomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ygeno



Evolutionary relationships of adenylation domains in fungi



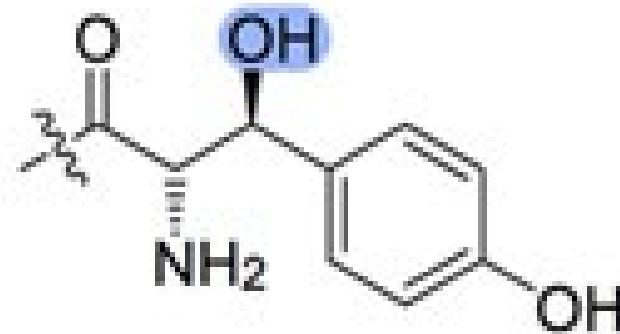
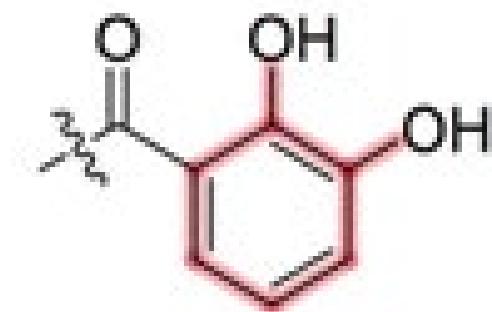
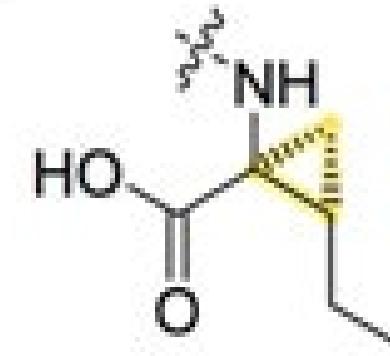
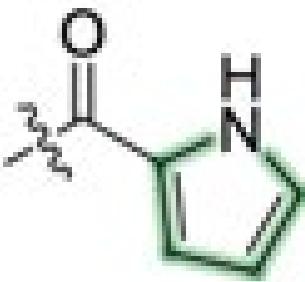
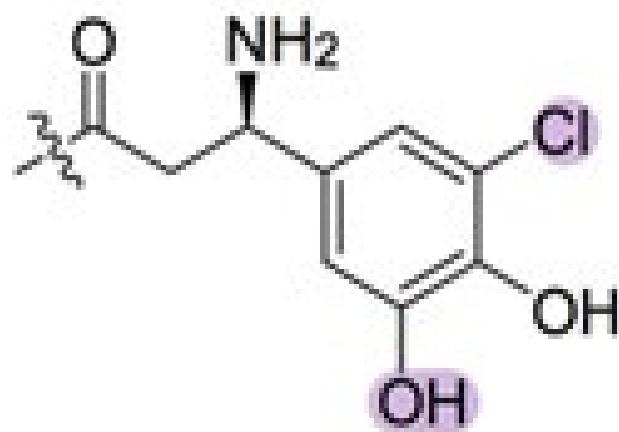
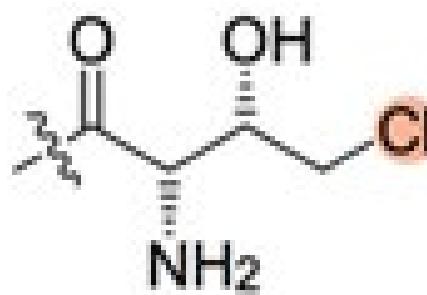
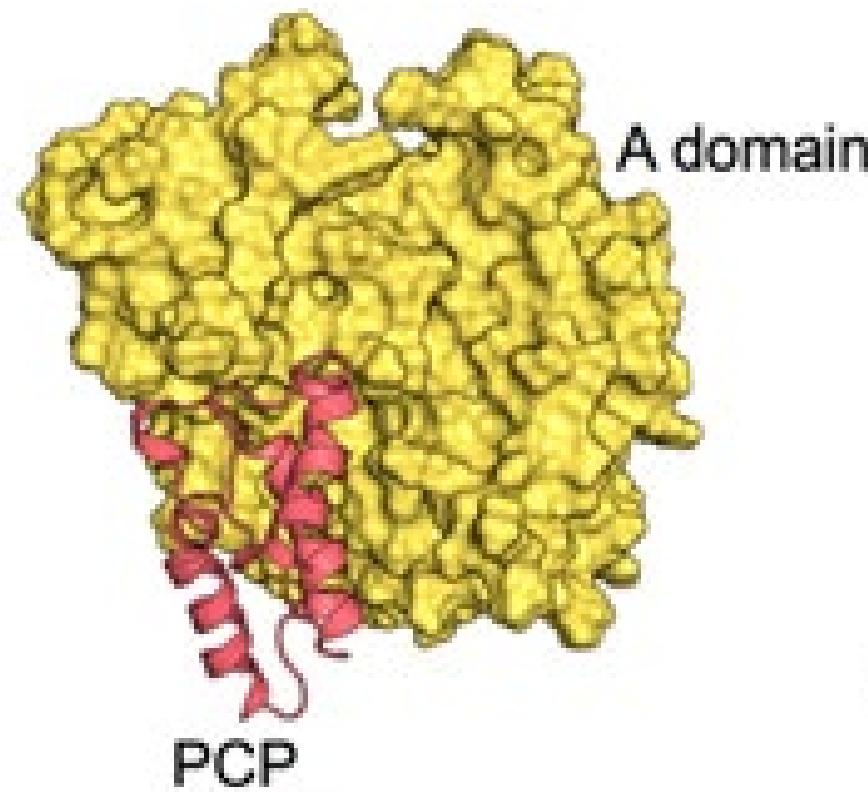
Sandriele Noriler^a, Jorge C. Navarro-Muñoz^{b,1}, Chirlei Glienke^{a,c}, Jérôme Collemare^{b,*}

^a Postgraduate Program of Microbiology, Parasitology and Pathology, Department of Pathology, Universidade Federal do Paraná, Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, 210, CEP: 81531-970, Curitiba, PR, Brazil

^b Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Uppsalaalaan 8, 3584, CT, Utrecht, the Netherlands

^c Postgraduate Program of Genetics, Department of Genetics, Universidade Federal do Paraná, Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, 210, CEP: 81531-970, Curitiba, PR, Brazil

type II NRPS

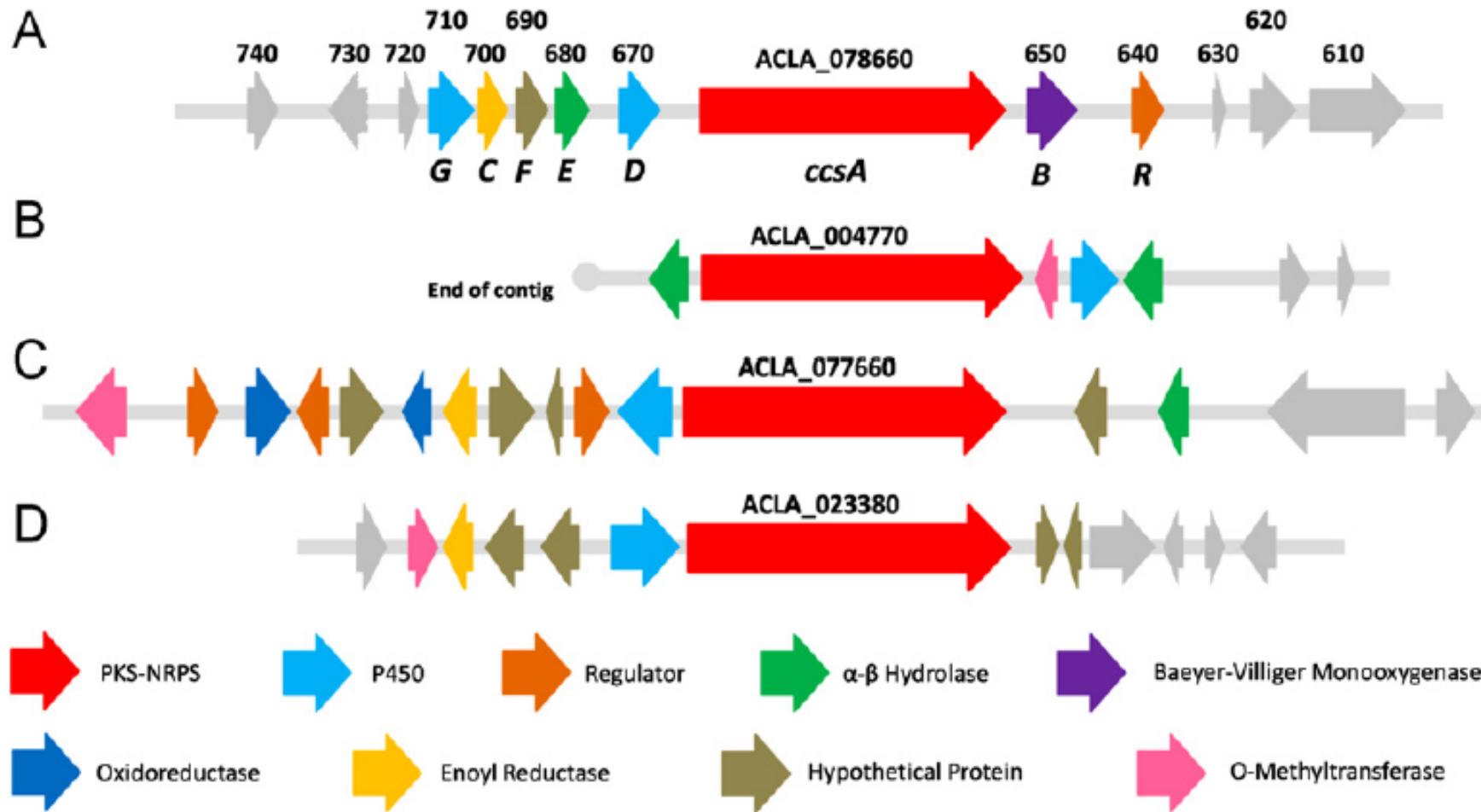


Metabólitos secundários fúngicos

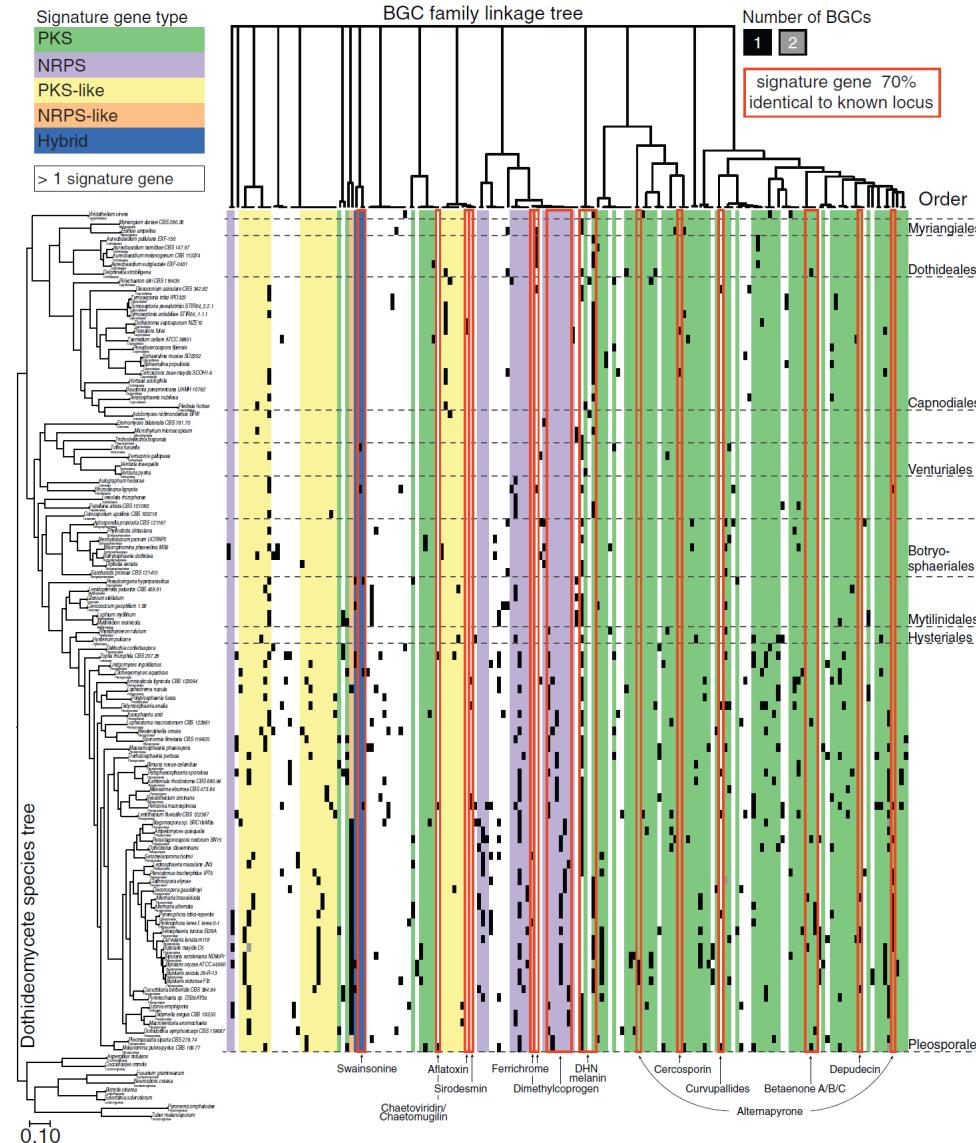
- Enzimas core PKSs e NRPSs:
 - são grandes proteínas de múltiplos domínios
 - todos os domínios operam conjuntamente para apoiar a síntese de um intermediário crescente
- produtos sintetizados por enzimas core são geralmente modificadas posteriormente por enzimas tailoring para produzir o composto ativo final

Organização do gene cluster ccs e outros loci PKS – NRPS no genoma de *Aspergillus clavatus*

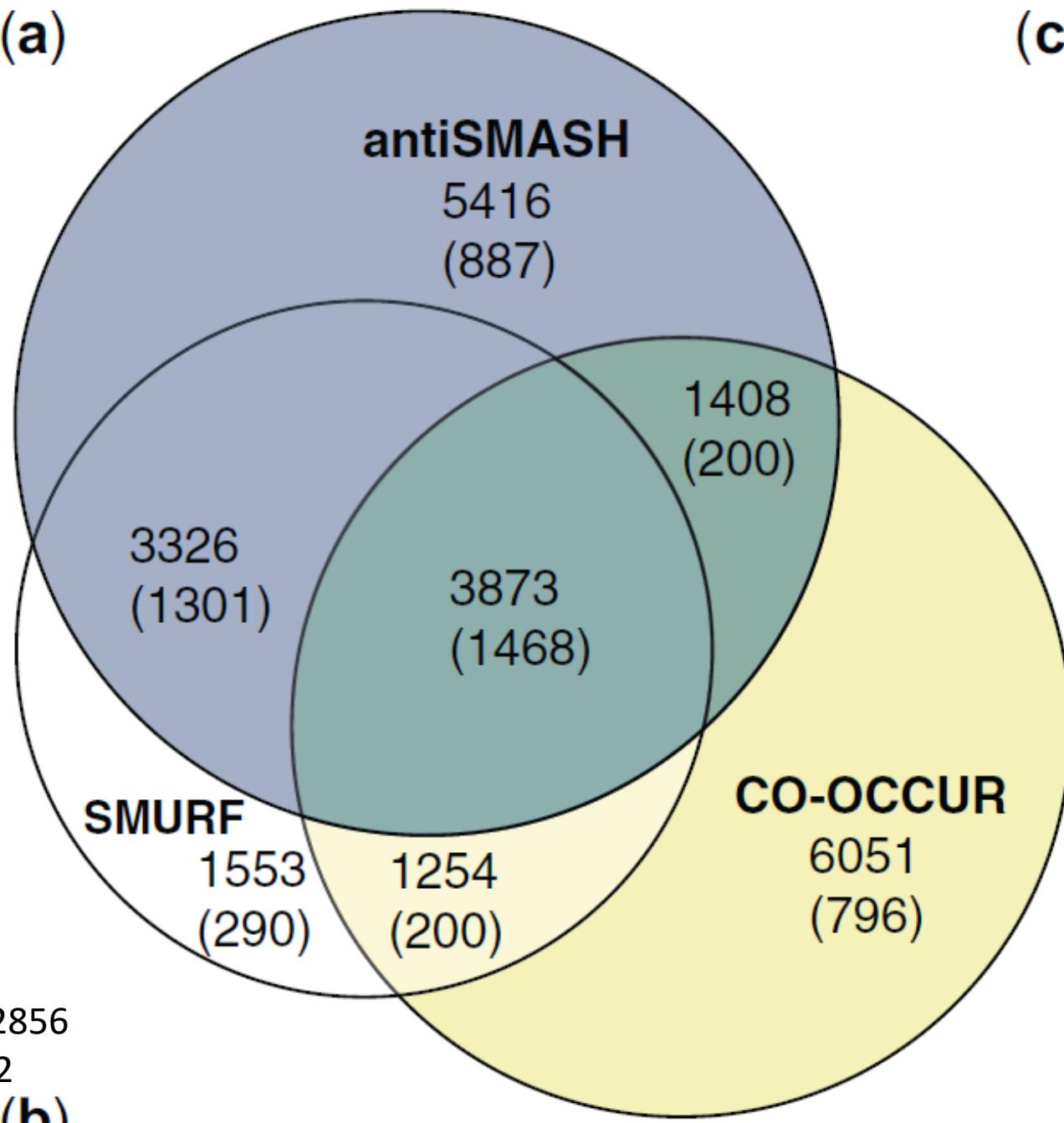
K. Qiao et al. / Metabolic Engineering 13 (2011) 723–732



Diversidade dos maiores grupos de genes de SMs detectados em 101 Dothideomycetes



(a)

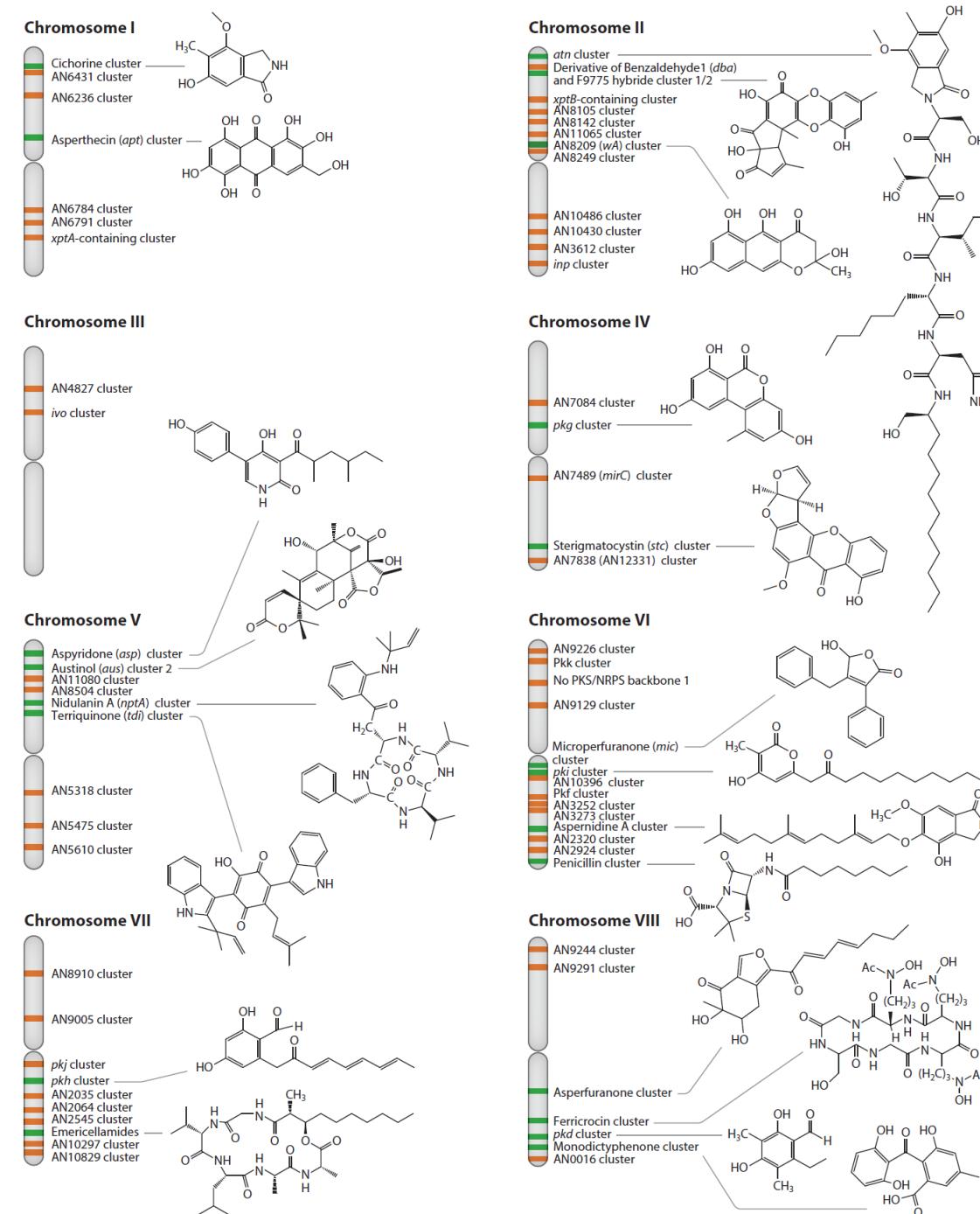


(c)



(h)

O que sabemos sobre a complexidade SM?



Não muito:

Aspergillus nidulans possui 68 grupos de genes SM em 8 cromossomos, mas os produtos de apenas 20 são conhecidos!

Quais clusters SM são ativados em confrontos?

Quão tóxicos são os compostos produzidos nos confrontos?

Como a ativação do agrupamento de genes SM é controlada?

From:

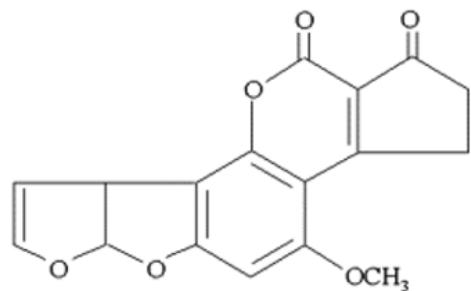
Macheleidt et al. 2016 Annu. Rev. Genet. 50, 371-392



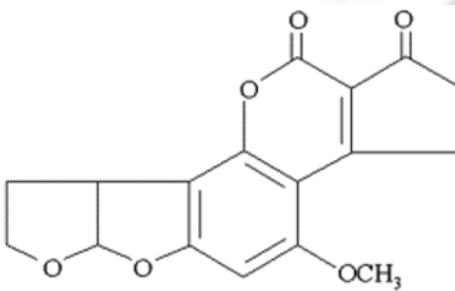
Produção de Aflatoxina em *Aspergillus flavus* – controlada por fatores epigenéticos

Aflatoxins and the Aflatoxin gene cluster

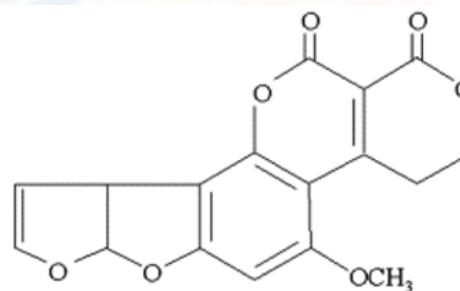
Ehrlich et al. 2005, J. Appl. Microbiol. 99, 518-527
Wang et al. 2016 Toxins 8, 46
Georgianna and Payne 2009 FGB 46, 113-125



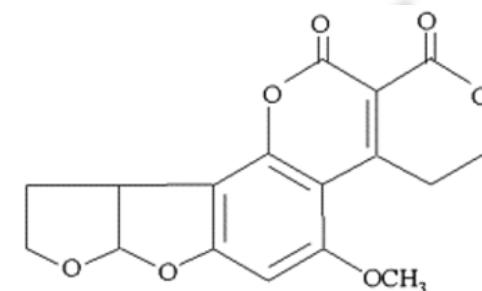
AFB1



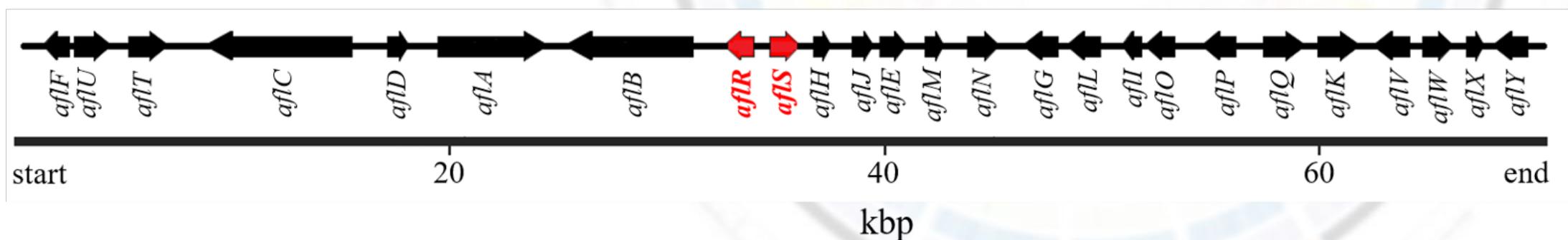
AFB2



AFG1

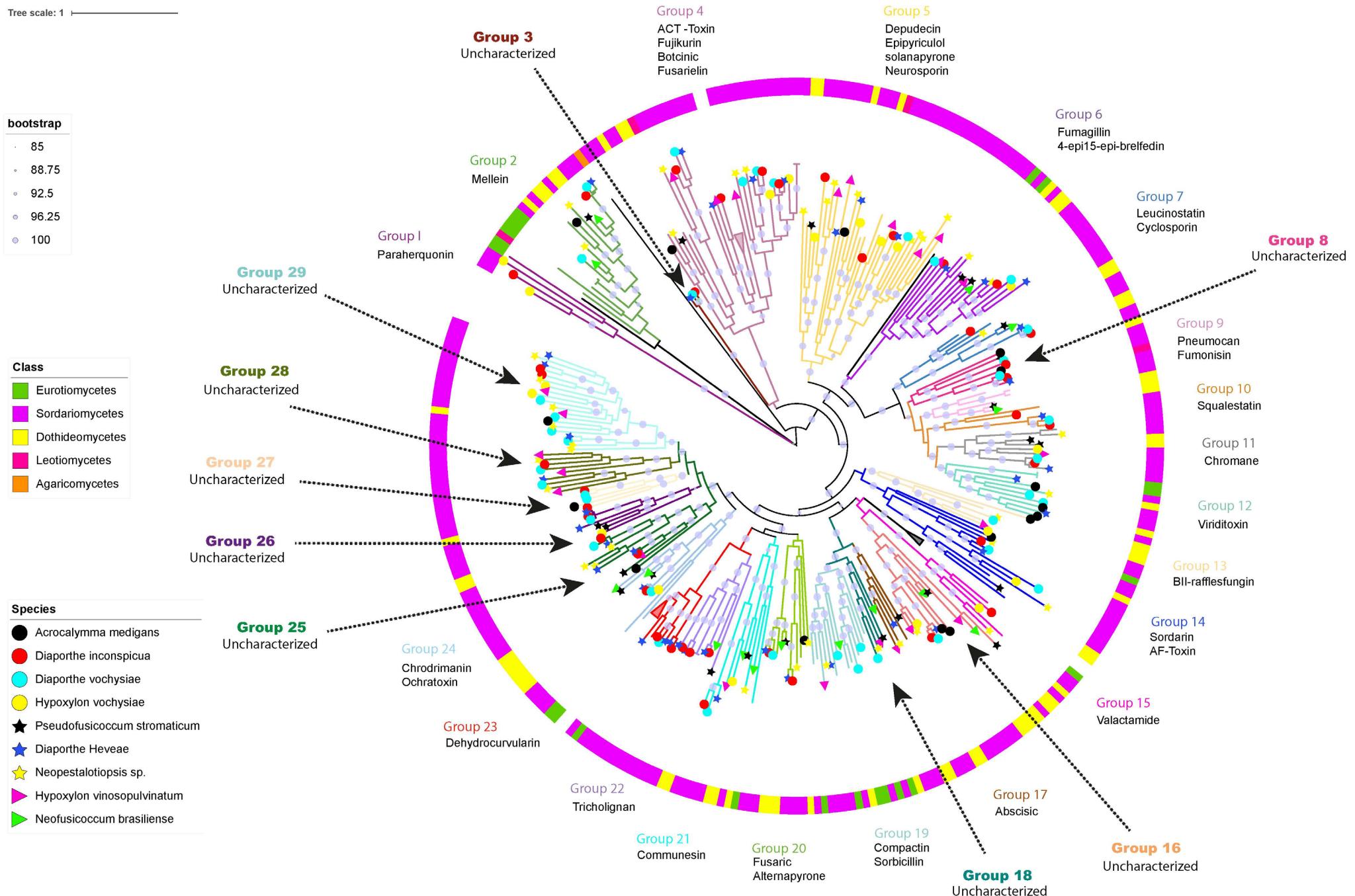


AFG2

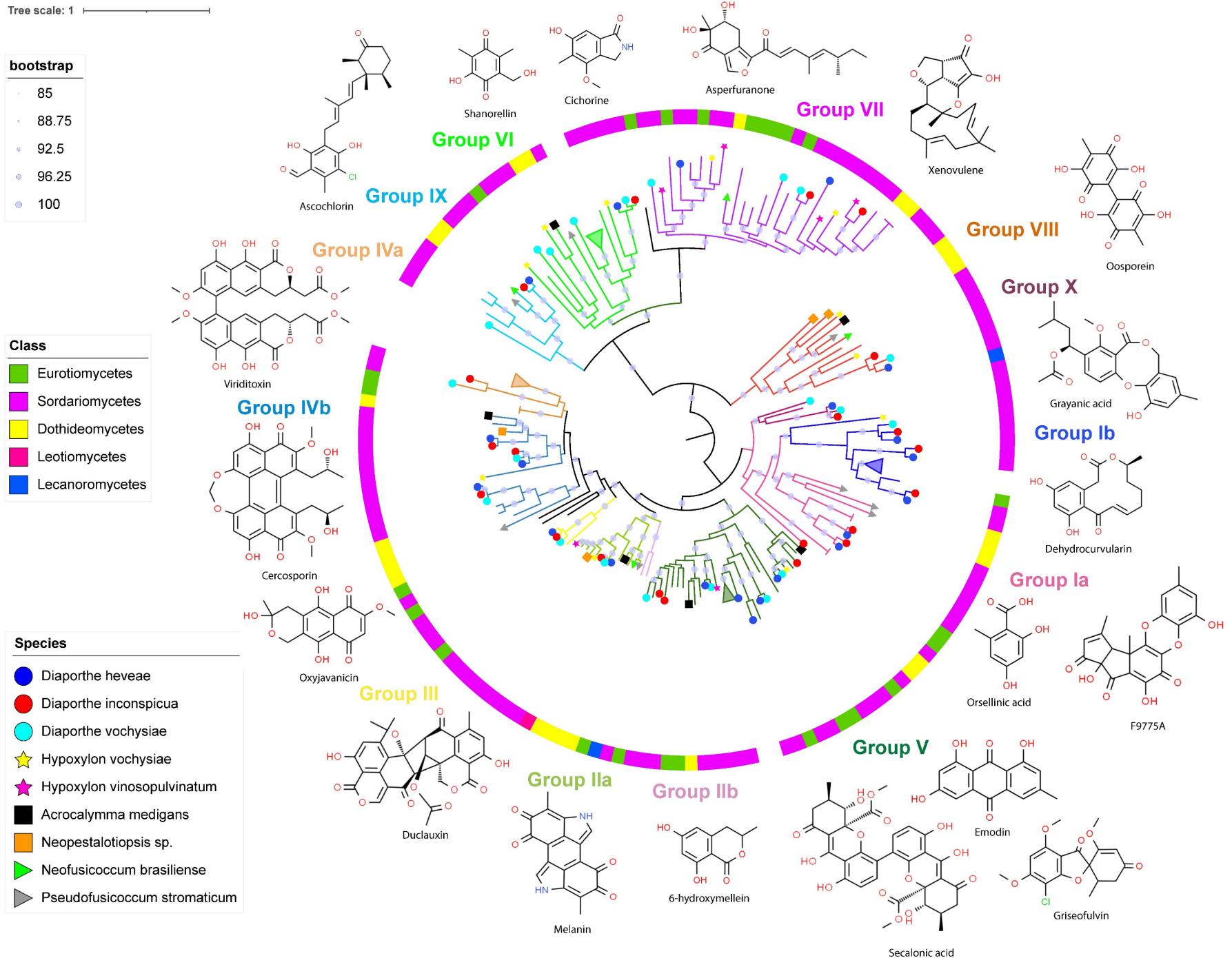


A acetilação das histonas é necessária para a ativação do promotor de *aflR* e para a ativação do cluster *afl*

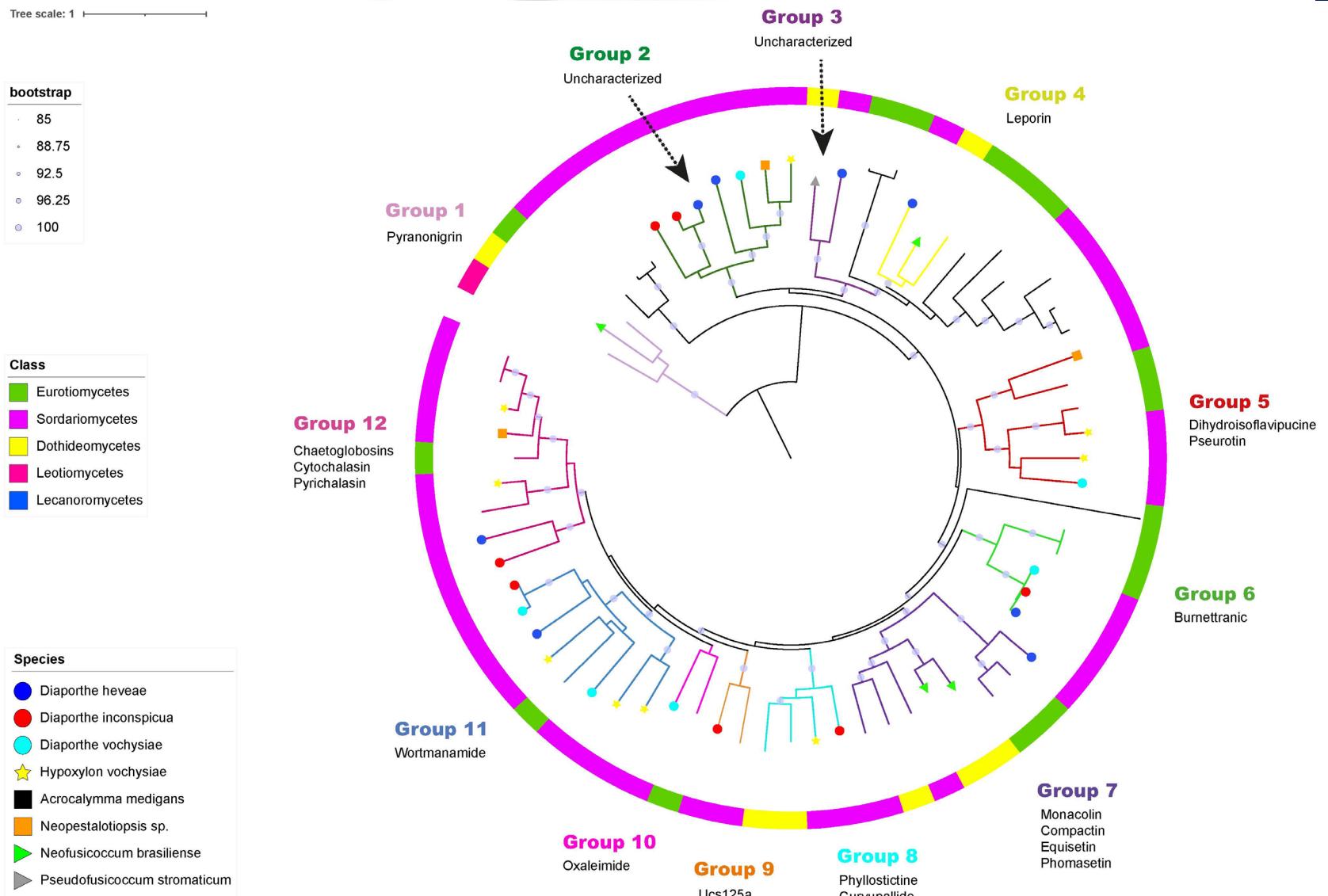
rPKS



nrPKS



Hibrido PKS- NRPS



Cytochalasins

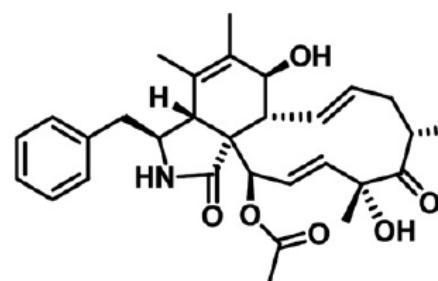
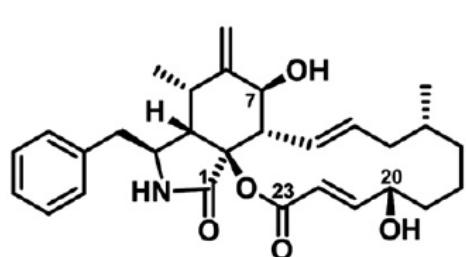
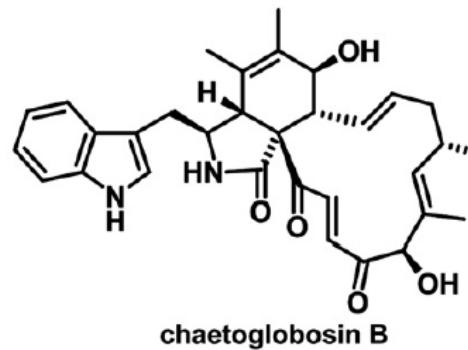
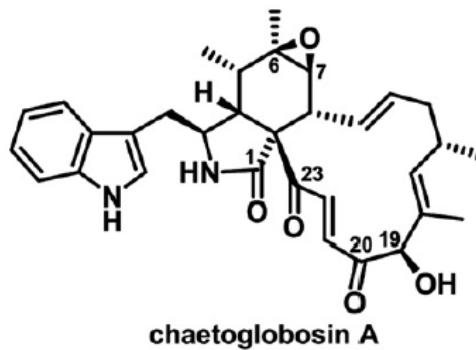
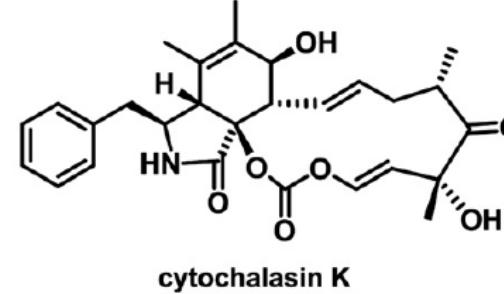
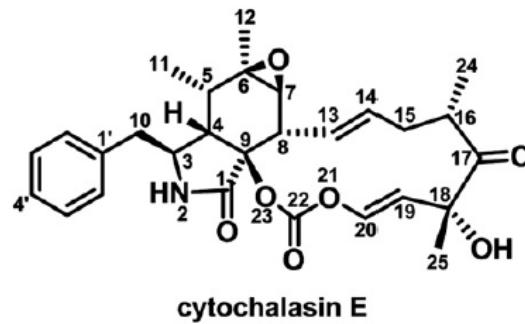


Fig. 1. Chemical structures of selected cytochalasans.

Via Biosintética proposta para cytochalasin E e K

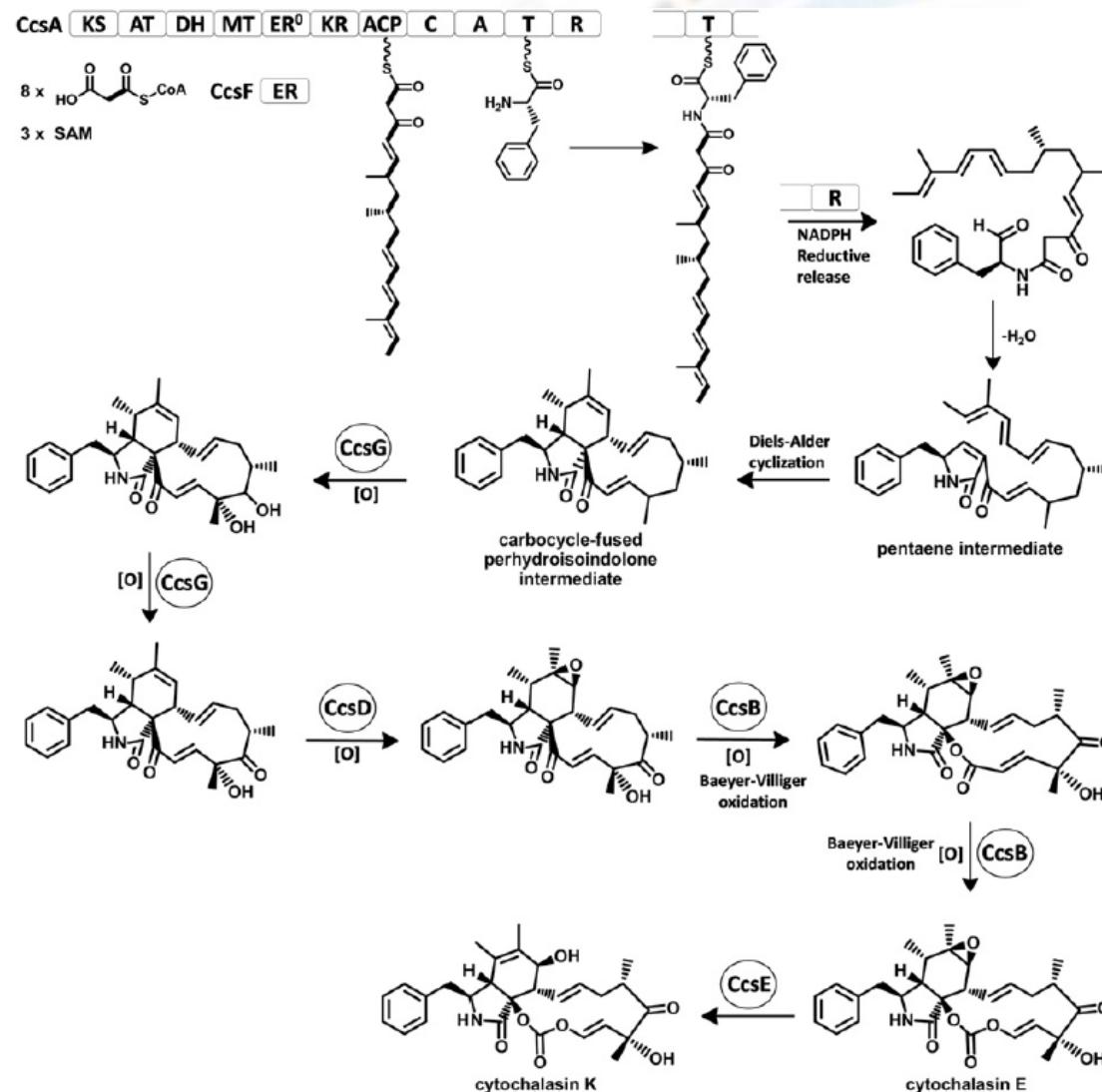
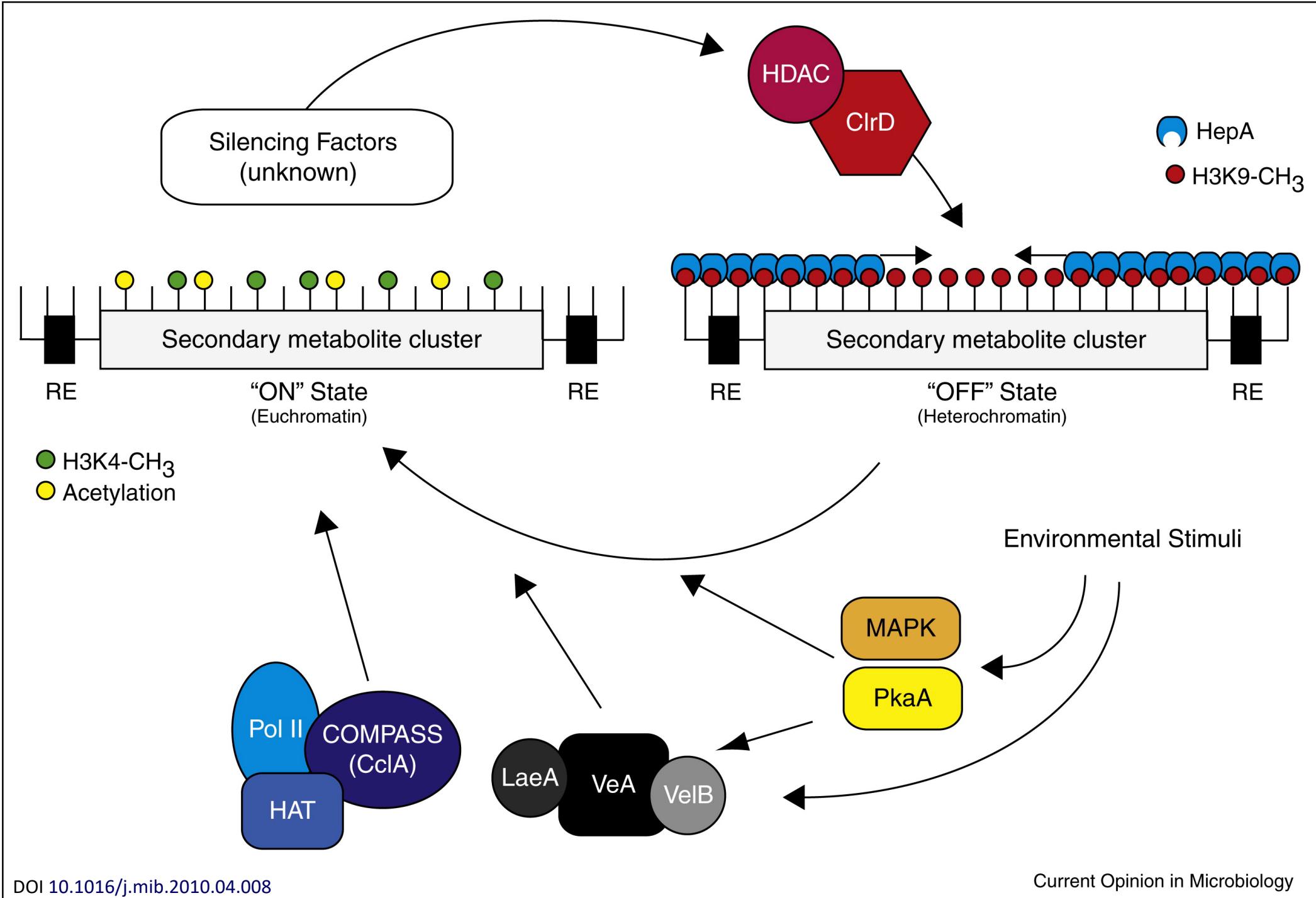


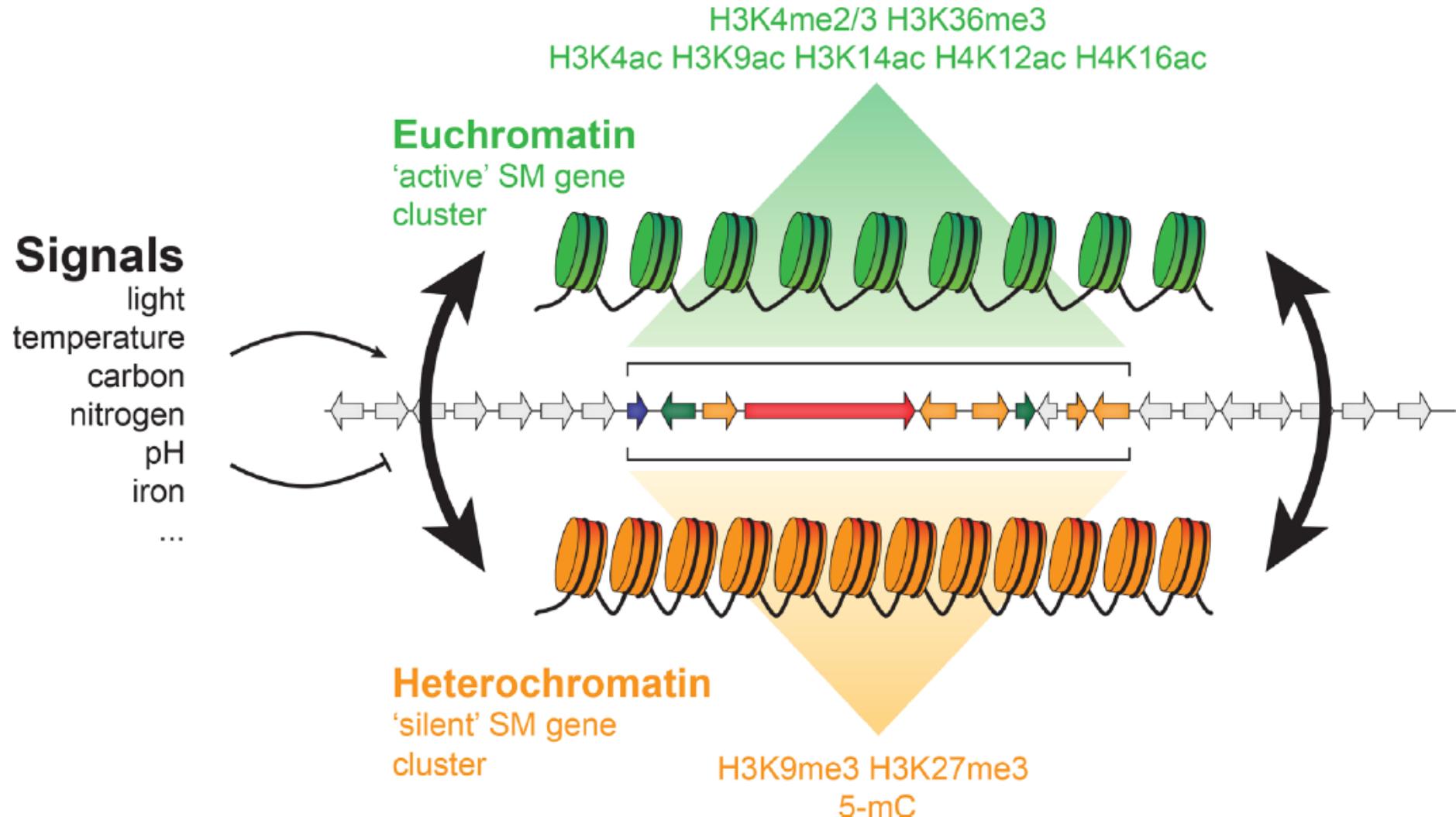
Fig. 5. Proposed biosynthetic pathway for cytochalasin E and K.

Metabólitos secundários

- Produzidos por fungos e bactérias
 - Gene clusters
 - grupos de genes co-regulados (mecanismos epigenéticos são importantes)
 - frequentemente localizados subtelomericamente ou em regiões de heterocromatina facultativa, que podem ser silenciadas e ativadas
 - proteínas envolvidas na remodelação da cromatina, como LaeA, CtrD, CclA e HepA atuam na sua regulação
 - frequentemente ladeado por elementos repetitivos (REs)
 - localizados a ordem e a localização dos genes dentro do cluster são importantes para sua regulação



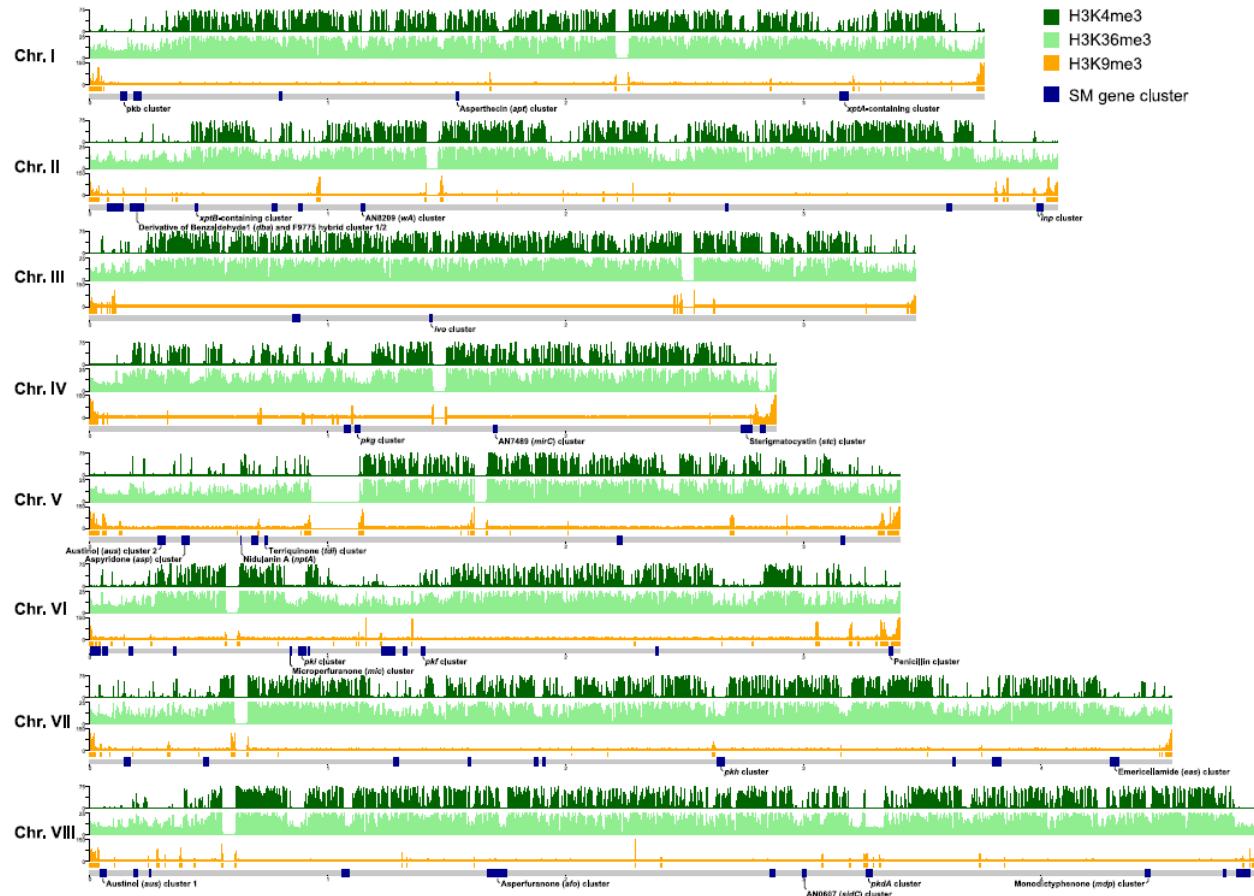
A cromatina impacta a regulação da transcrição de BGCs



BGCs em *Aspergillus nidulans*

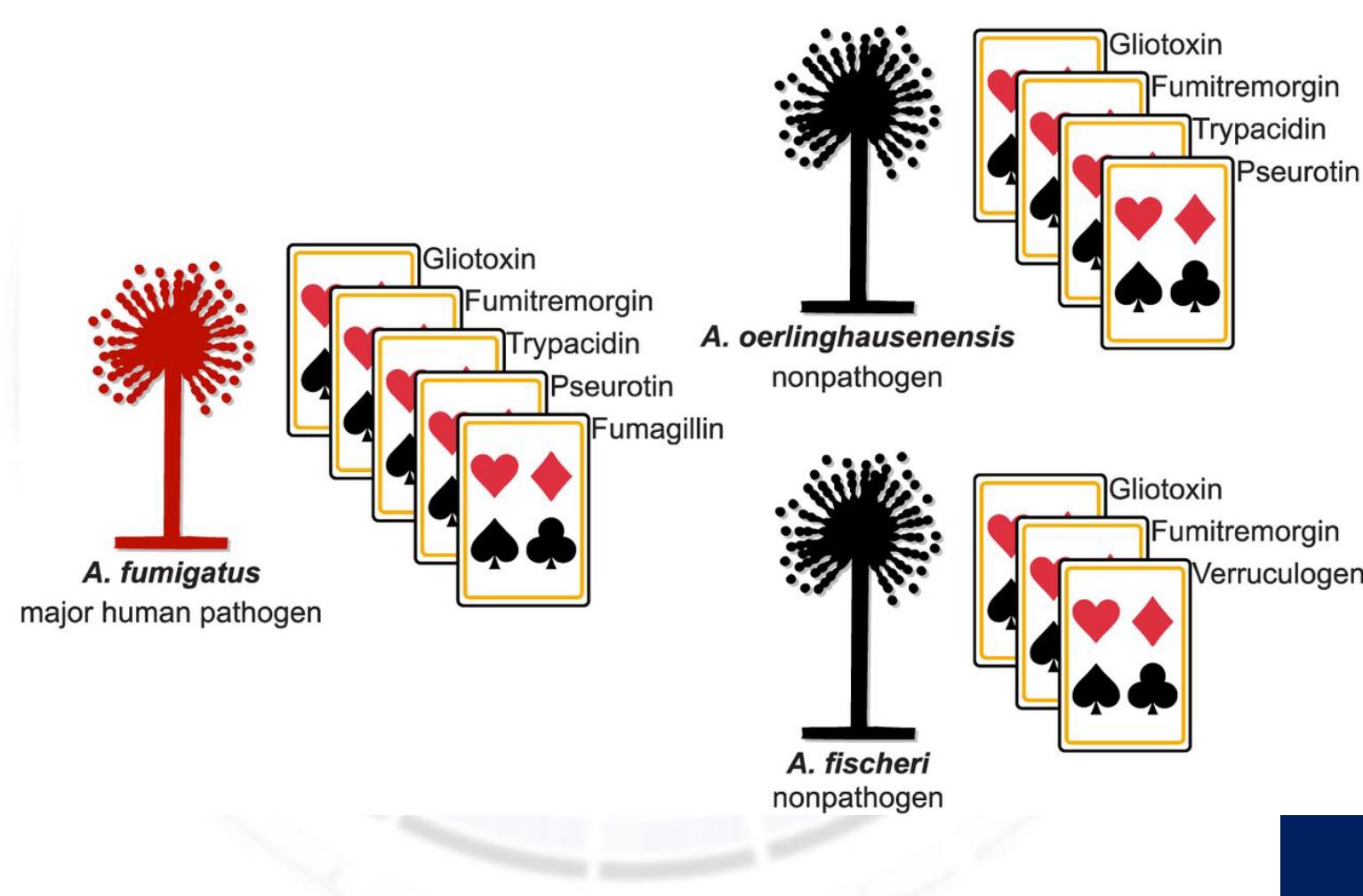
BGCs associados a diferentes tipos de cromatina:

- eucromáticas (H3K4me3 verde-escuro e H3K36me3 verde-claro)
- heterocromáticas (H3K9me3; laranja)

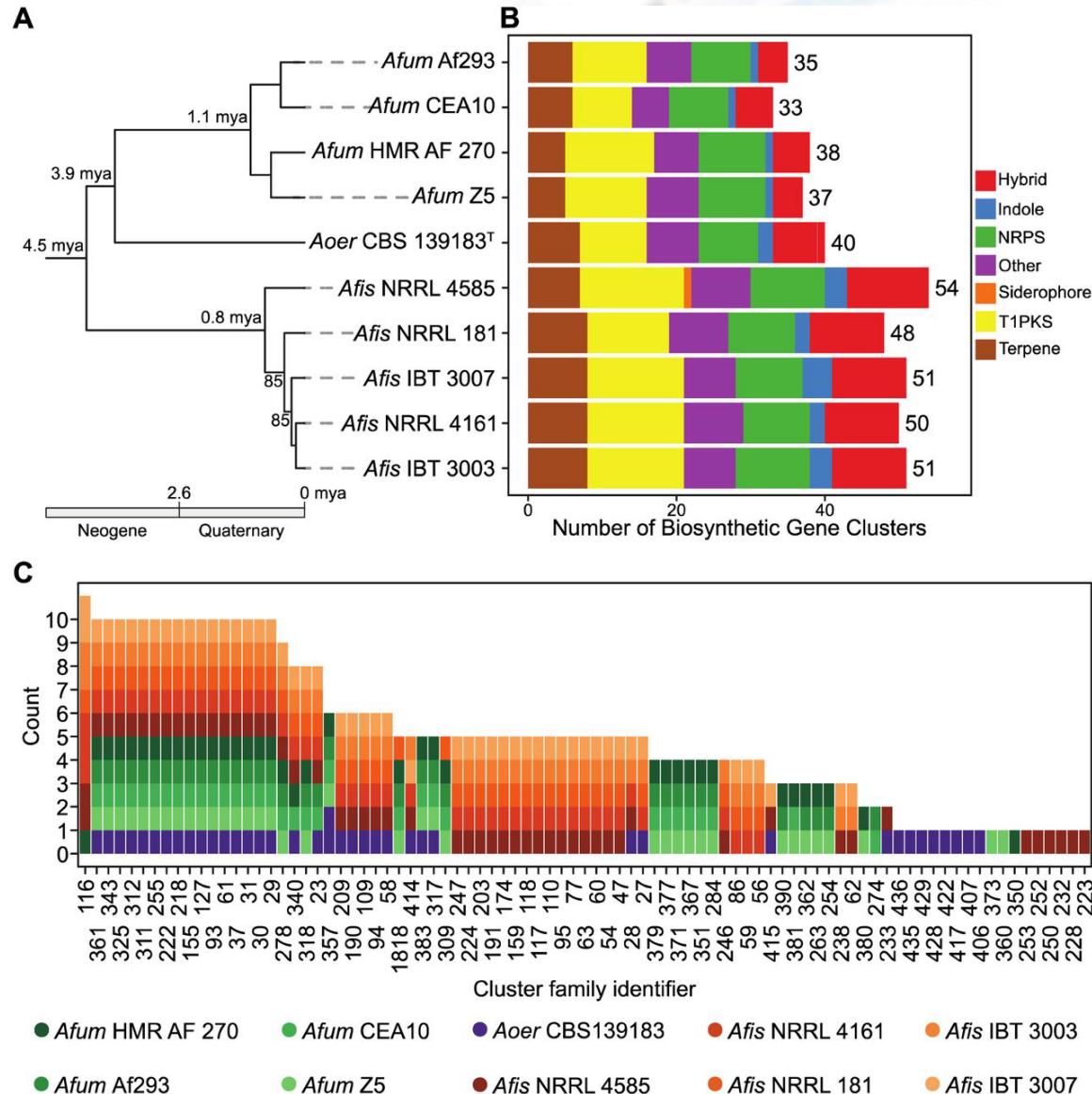


BGCs em *Aspergillus* spp. - “cartas” de patogenicidade

- prejudicam o sistema imunológico do hospedeiro
- protegem o fungo de ataques do sistema imune do hospedeiro
- adquirem nutrientes essenciais
- evoluem rapidamente e sua composição pode diferir substancialmente entre espécies e linhagens



BCGs em 3 espécies de *Aspergillus*



Afum: *A. fumigatus*;

Aoer: *A. oerlinghausenensis*;

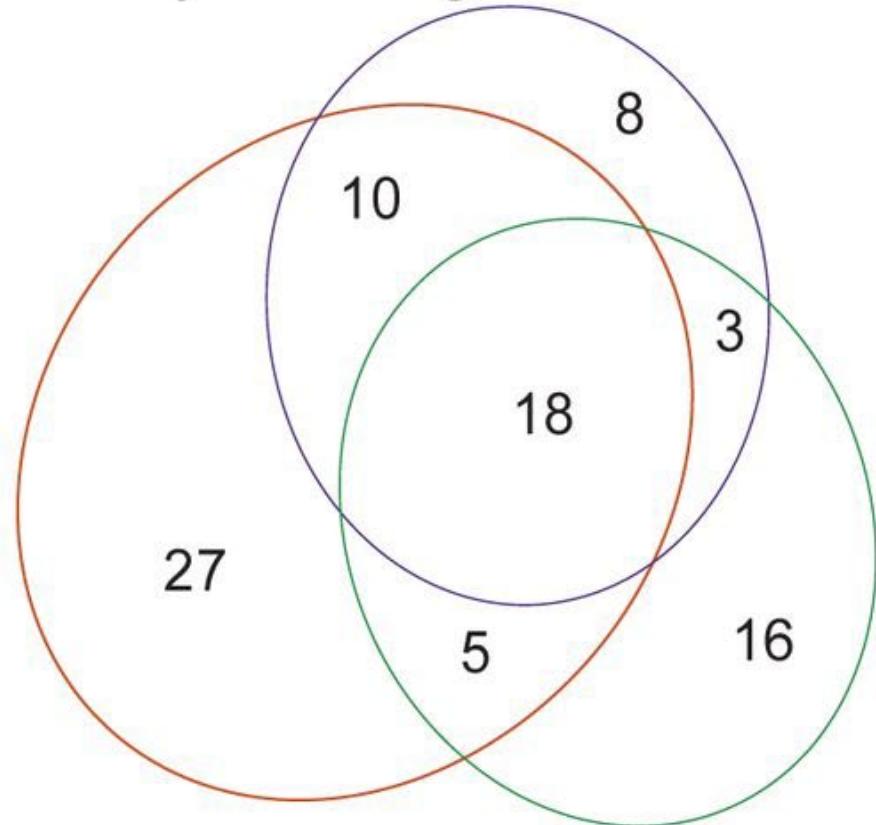
Afis: *A. fischeri*.

doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.09.033902>

Aspergillus oerlinghausensis compartilha mais famílias de genes e BGCs com *A. fischeri* do que com *A. fumigatus*

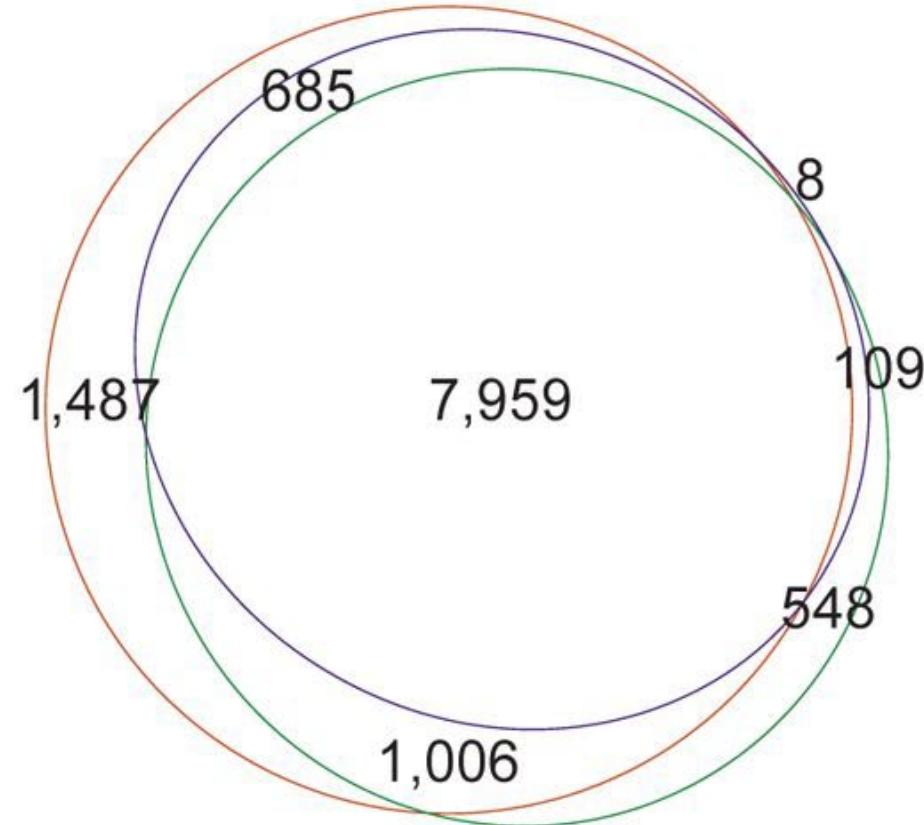
A

Biosynthetic gene clusters



B

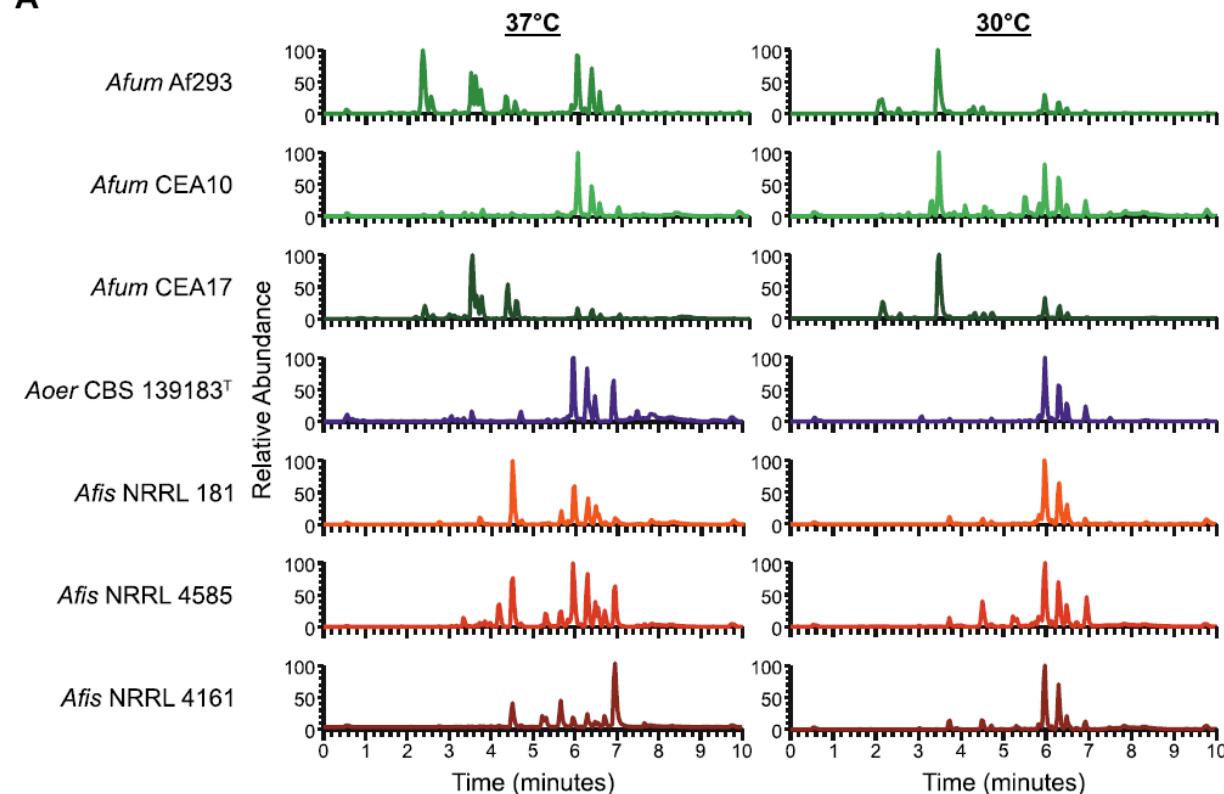
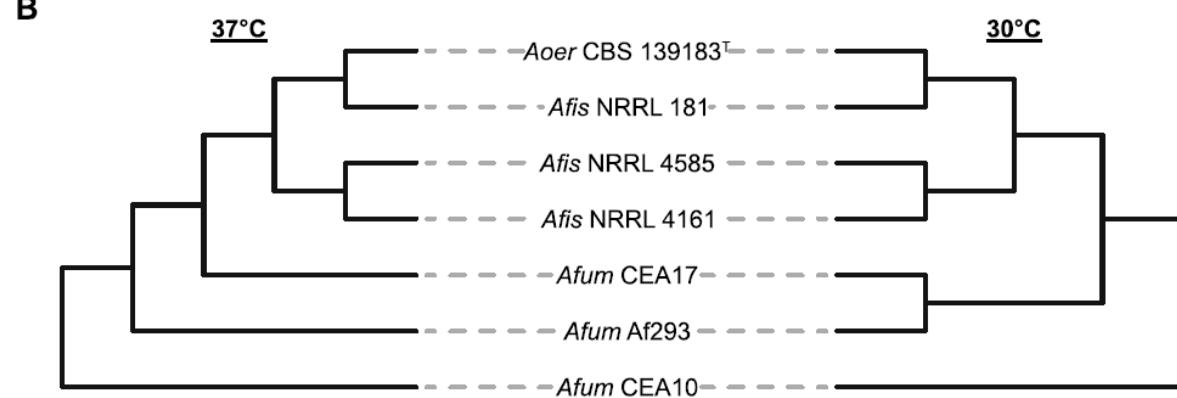
Gene families



● *Aspergillus fischeri*

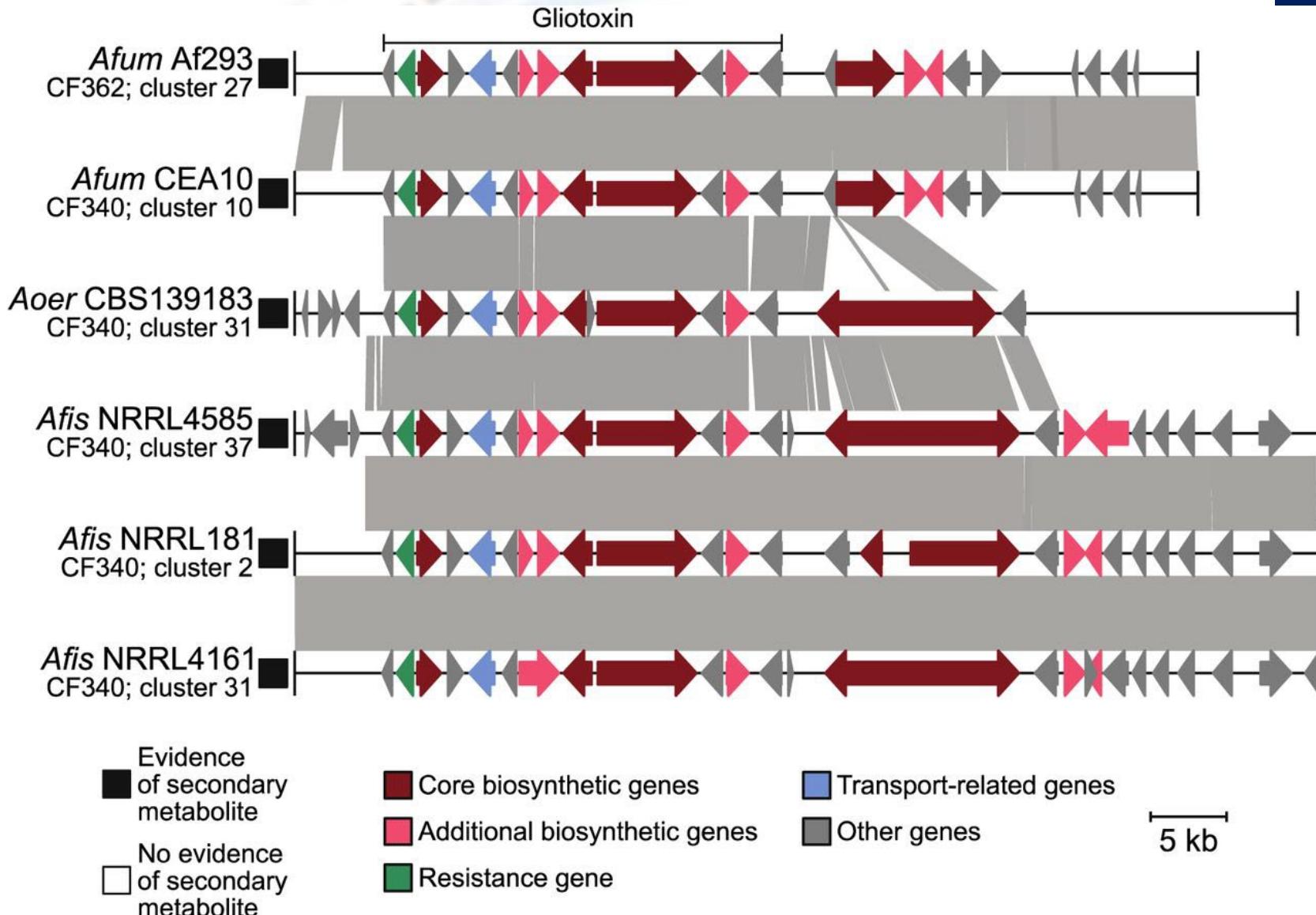
● *Aspergillus oerlinghausensis*

● *Aspergillus fumigatus*

A**B**

Gliotoxina BGC em *Aspergillus* spp.

Conservação no BGC de gliotoxina correlaciona-se com a produção conservada de análogos de gliotoxina em *A. fumigatus* e espécies próximas não patogênicas



OPEN

Phaeophleospora vochysiae Savi & Glienke sp. nov. Isolated from *Vochysia divergens* Found in the Pantanal, Brazil, Produces Bioactive Secondary Metabolites

Received: 14 June 2017

Accepted: 29 January 2018

Published online: 15 February 2018

Daiani C. Savi^{1,2}, Khaled A. Shaaban^{2,3}, Francielly Maria Wilke Ramos Gos¹, Larissa V. Ponomareva^{2,3}, Jon S. Thorson^{2,3}, Chirlei Glienke¹ & Jürgen Rohr²

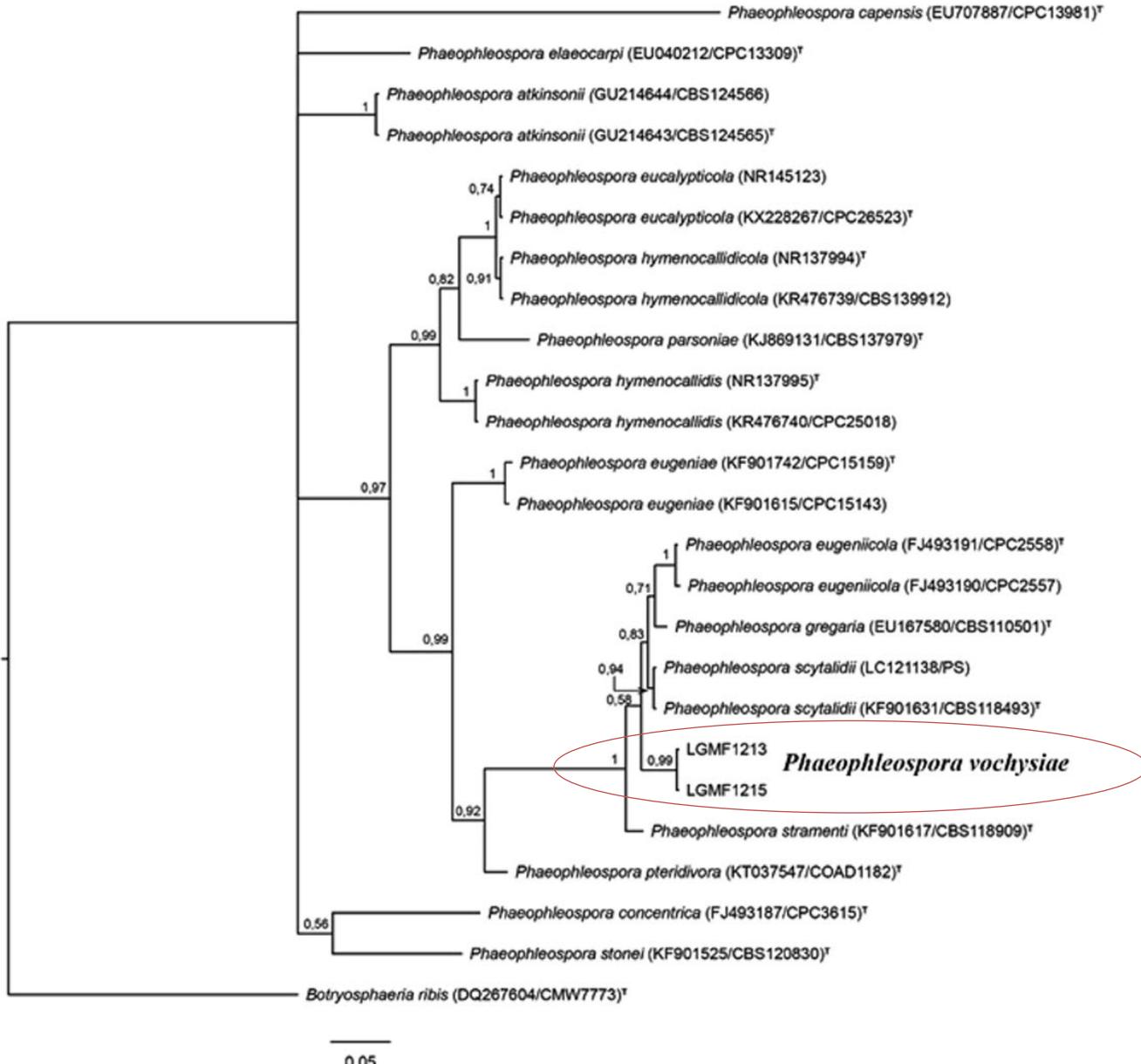


Figure 1. Bayesian phylogenetic tree based on ITS sequence of rRNA gene of LGMF1215 and LGMF1213 and 15 described species of *Phaeophleospora* genus. Values on the node indicate Bayesian posterior probabilities. The species *Botryosphaeria ribis* was used as outgroup. Scale bar indicates the number of substitutions per site.

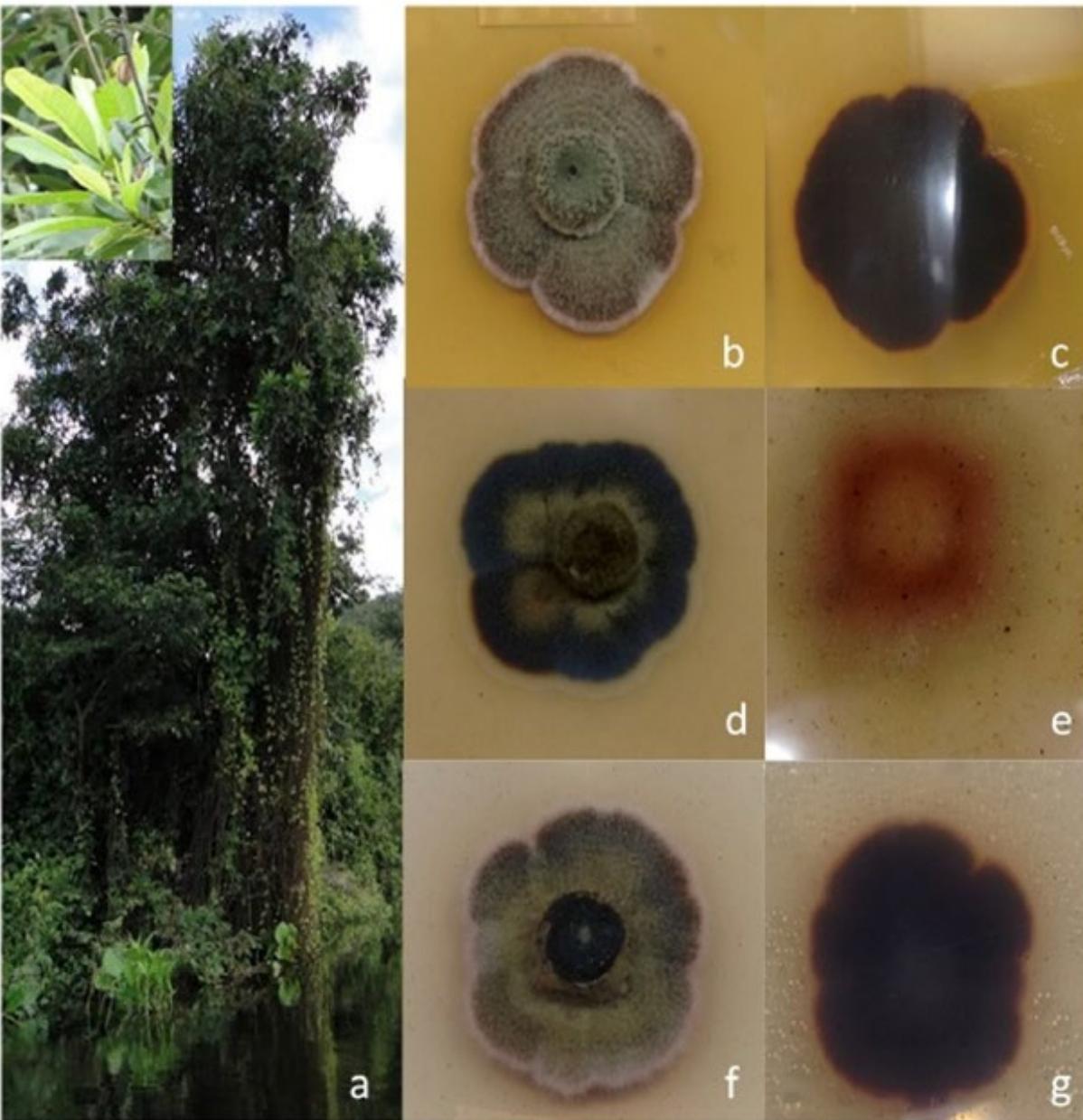


Figure 2. Host and morphology of *Phaeophleospora ochrysiae* LGMF1215 on Malt Extract Agar (MEA), Oatmeal Agar (OA) and Potato Dextrose Agar (PDA) at 28 °C after 14 days. (a) *Vochysia divergens* (b and c) Colony on MEA surface and reverse; (d and e) colony on OA surface and reverse; (f and g) colony on PDA surface and reverse.

Phaeophleospora vochysiae



Figure 3. Macro- and micro-morphology of *Phaeophleospora vochysiae* LGMF1215. (a) Colony with pycnidium (arrow). (b and c) Mycelium consisting of septate, branched, verruculose hyphae in some points with red pigment inside. (d) Conidiophore and conidium. (e-g) Conidia. (h) Conidiophore.

Three major compounds with high biological activity

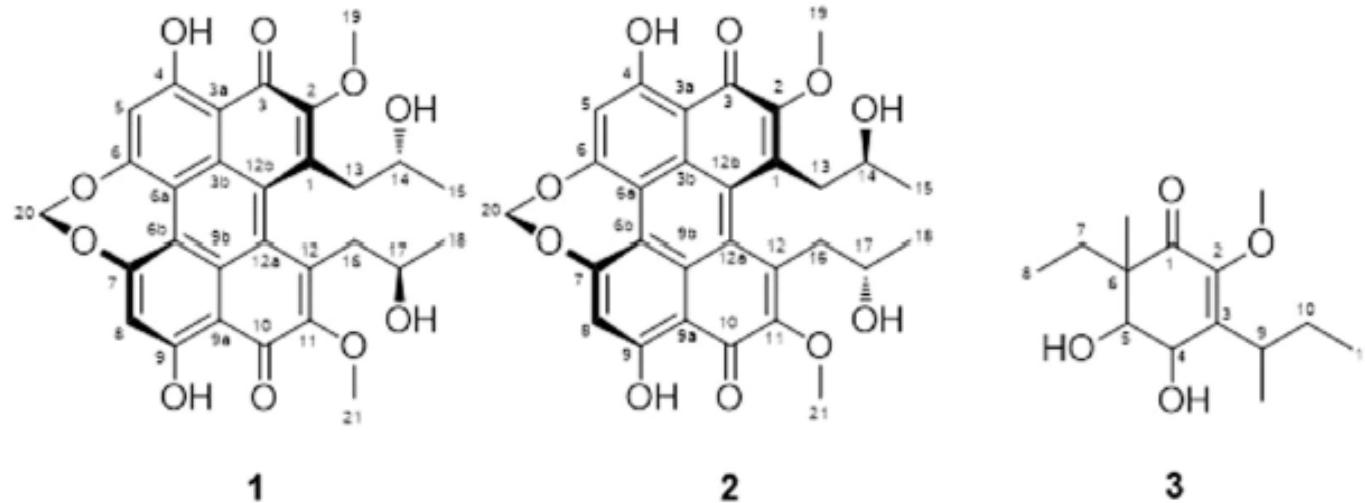


Figure 4. Chemical structures of compounds 1–3.

Two known compounds:

cercosporin (1)

isocercosporin (2)

One new compound:

3-(sec-butyl)-6-ethyl-4,5-dihydroxy-2-methoxy-6-methylcyclohex-2-enone (3)