



Análise do perfil metabólico pré e pós deleção do gene histona deacetilase no fungo *Penicillium* sp.

Daniel Y. Akiyama*, Jonas H. Costa, Taicia P. Fill.

Resumo

Os microorganismos são as principais fontes de moléculas biologicamente ativas e terapeuticamente úteis, incluindo anticancerígenos, imunossuppressores, antibióticos, inseticidas, etc. A biossíntese dos produtos naturais fúngicos é regulada por clusteres gênicos, que se encontram silenciados em condições de cultivo padrão em laboratório. Para induzir a expressão destes genes, pode-se utilizar engenharia genética. Este trabalho visa a manipulação genética dos modificadores de estrutura da cromatina, uma vez que modificações nas histonas tem um papel importante na regulação da expressão gênica.

Palavras-chave:

produtos naturais, metabolômica, ativação de clusteres biossintéticos

Introdução

O fungo *Penicillium* sp. apresenta um grande potencial de produção de metabólitos secundários bioativos, conforme verificado em análises funcionais do genoma deste microorganismo. Entretanto, a partir de condições padrão de cultivo em laboratório, muitas vezes não conseguimos acesso a estes produtos naturais, sendo que a maioria de seus clusteres biossintéticos encontram-se silenciados. Uma das abordagens utilizadas para promover a ativação destes clusteres gênicos é a alteração da configuração da cromatina. Neste projeto, objetivamos a deleção do gene HdaA do fungo *Penicillium* sp., como uma estratégia para ativação da produção de produtos naturais. A comparação do perfil metabólico do fungo selvagem e do mutante será realizada por LC-MS/MS.

Resultados e Discussão

O gene HdaA, codificante para a enzima histona deacetilase, foi deletado a partir de recombinação homóloga, utilizando higromicina como marcador de seleção. O cassete de deleção foi construído a partir de recombinação homóloga em *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando as regiões flangeadoras da ORF de interesse.

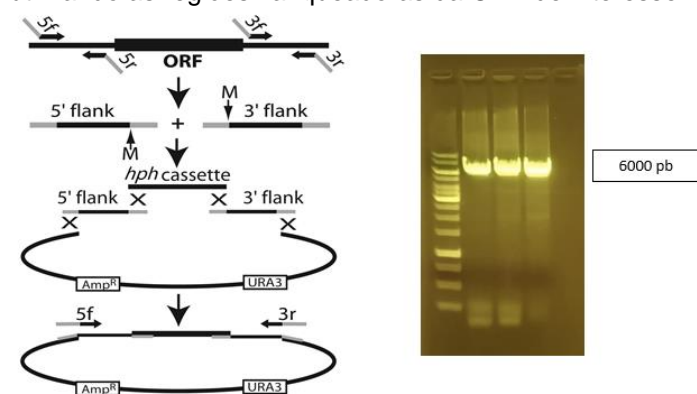


Figura 1: Estratégia para construção do cassete de deleção e gel de agarose 1% do cassete de deleção obtido para o gene HdaA

A transformação em *Penicillium* sp. foi realizada a partir da geração de protoplastos e mediação química com PEG. As transformações no fungo de interesse resultaram em 10 candidatos que estão sendo avaliados por PCR.

A ativação de clusteres biossintéticos também pode ser feita pela adição de moduladores epigenéticos, que alteram a expressão gênica sem alterar o genoma do microorganismo. Neste estudo, foi utilizado o ácido hidroxâmico suberoilânida (SAHA) como inibidor da enzima histona deacetilase. Os extratos do fungo cultivado com SAHA foram analisados por LC-MS/MS e *molecular networking* e comparados com os extratos do fungo selvagem.

Na figura abaixo, é possível identificar em qual extrato cada metabólito foi obtido, além de agrupá-los em clusteres baseados em sua semelhança estrutural.

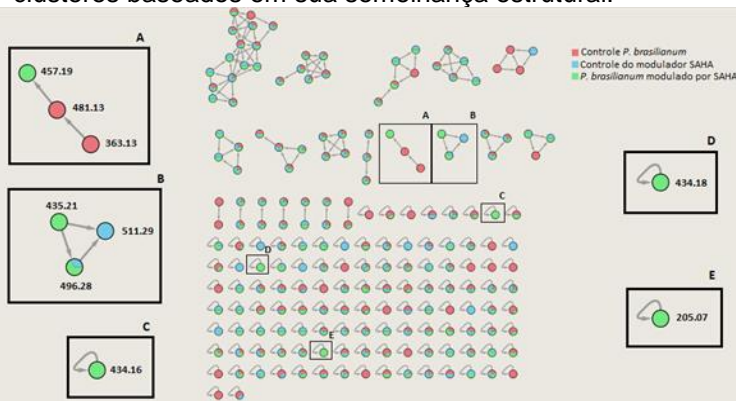


Figura 2: Análises de *molecular networking* dos extratos de *P. brasiliense* cultivado com o modulador SAHA e seus controles.

A identificação dos íons de interesse está sendo realizada.

Conclusões

Os resultados preliminares evidenciam a influência da configuração da cromatina na expressão de produtos naturais fúngicos. A deleção do gene HdaA, portanto, é uma estratégia relevante para a obtenção de diversidade estrutural de produtos naturais.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Biologia Química Microbiana LaBioQuiMi/IQ/UNICAMP e toda sua equipe e à FAPESP pelo financiamento.

¹ NIELSEN, J. C. et al. Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species. *Nature Microbiology*, v. 2, n. 6, 3 abr. 2017.