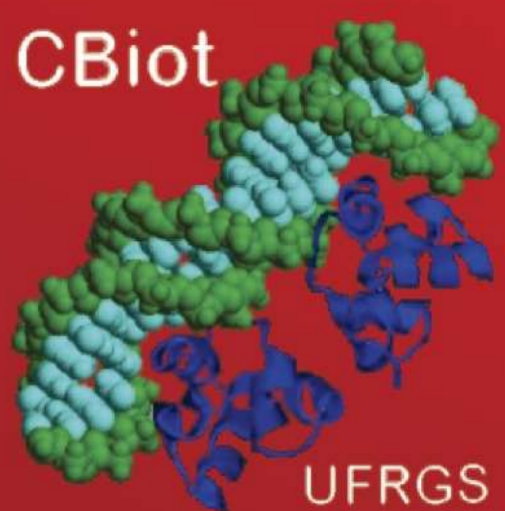


Prospecção de novos genes envolvidos no metabolismo de zinco em *Cryptococcus gattii*

Camila Diehl da Rosa¹, Charley Christian Staats^{1,2}.

¹ Centro de Biotecnologia

² Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia - Instituto de Biociências, UFRGS.



INTRODUÇÃO

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são leveduras basidiomicéticas, agentes etiológicos da criptococose, uma doença fatal que acomete seres humanos e outros mamíferos e são responsáveis por aproximadamente 1 milhão de casos de meningoencefalite por ano, resultando em cerca de 625.000 mortes¹. Durante o processo infeccioso a homeostase de metais nos patógenos deve ser finamente regulada, pois o excesso ou escassez de alguns destes metais pode produzir um ambiente tóxico para a célula. Trabalhos recentes, desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, demonstraram a importância do adequado metabolismo do zinco na virulência de *C. gattii*^{2,3}, sendo esse mais sensível a privação de zinco que de ferro. Assim, um melhor entendimento do metabolismo de metais essenciais em *C. gattii* pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas⁴. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi identificar novos genes envolvidos no metabolismo de zinco em *C. gattii*.

METODOLOGIA

Inicialmente, um *screening* realizado em uma biblioteca de mutantes insercionais aleatórios de *C. gattii* (linhagem R265), contendo cerca de 8.000 mutantes foi realizada e levou à identificação de um mutante (25-C12) com drástica redução de desenvolvimento em condições de privação de metais, obtidas com uso dos quelantes DTPA ou TPEN (dados não mostrados). Empregando técnicas de *chromosome walking*, identificamos o gene que se encontra interrompido nesse mutante selecionado – CNBG_1485, sendo então nomeado *ZRG1* pelo nosso grupo. Para a construção de mutantes nulos para o gene *ZRG1*, fragmentos de aproximadamente 1 kb das regiões 3' e 5' de flaqueamento do região codificante do gene foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico de *C. gattii* e purificadas em gel. Os fragmentos foram usados em uma reação de recombinação com o plasmídeo pDONR-NAT. Os vetores obtidos foram clivados e utilizados para transformação de células de *C. gattii* através de bombardeamento. Após as etapas de seleção e confirmação, obtivemos dois mutantes que apresentaram deleção do gene *ZRG1* (*ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219*). Utilizando esses mutantes, iniciamos ensaios de caracterização fenotípicas que possam estar associadas à inativação do gene *ZRG1*. Para todos os ensaios, nós realizamos um pré-cultivo em meio YPD líquido *over night*, sob agitação de 200 RPM a 30°C. Para os ensaios de concentração inibitória mínima (MIC), uma concentração de 10⁵ células foi inoculada em meio YNB acrescido de concentração específicas dos quelantes DTPA e TPEN e dos metais zinco e manganês em placas de 96 poços e, após o período de 24 h em estufa a 30°C, foi mensurada a O.D. 600 nm. Para realização do teste em gotas, placas de YPD sólido foram preparadas com concentrações específicas de reagentes estressores como NaCl, sorbitol, SDS e H₂O₂ e fármacos como Flucitosina, Flucanazole e Anfotericina B, onde uma diluição seriada de células foi gotejada e mantida em estufa a 30°C, para posterior avaliação. Para o ensaio de *GIEMSA*, nós realizamos a interação de uma concentração de 1x10⁶ células/mL de macrófagos murinos linhagem J774.1 ativadas com PMA com uma concentração de 1x10⁵ células/mL de *C. gattii* por um período de 2 h, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, o sistema foi fixado com metanol, corado com a reagente *GIEMSA* e avaliados por microscopia, a contagem das células foi realizada utilizando o *software ImageJ*. Para analisar o padrão de expressão do gene *ZRG1* e se esse é influenciada pela disponibilidade ou privação de metais, foi realizado o cultivo da linhagem R265 mutante para o gene *ZIP1* (gene que codifica uma proteína transportadora de afinidade a zinco, *ZIP1Δ*) e *WT* nas condições controle (meio YNB) e na condição de privação de metais, utilizando quelante DTPA e TPEN. As células foram congeladas e liofilizadas para posterior extração de RNA total, utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), e síntese de cDNA empregando oligo dT e a enzima Improm II (Promega), segundo as recomendações do fabricante. Foi realizada a análise de PCR Tempo Real utilizando o sistema SYBR Green Master Mix (Invitrogen) na plataforma AB StepOne Real Time Systems (Applied Biosystems). Os dados foram analisados pelo método de Livak e Schmittgen (2001).

RESULTADOS

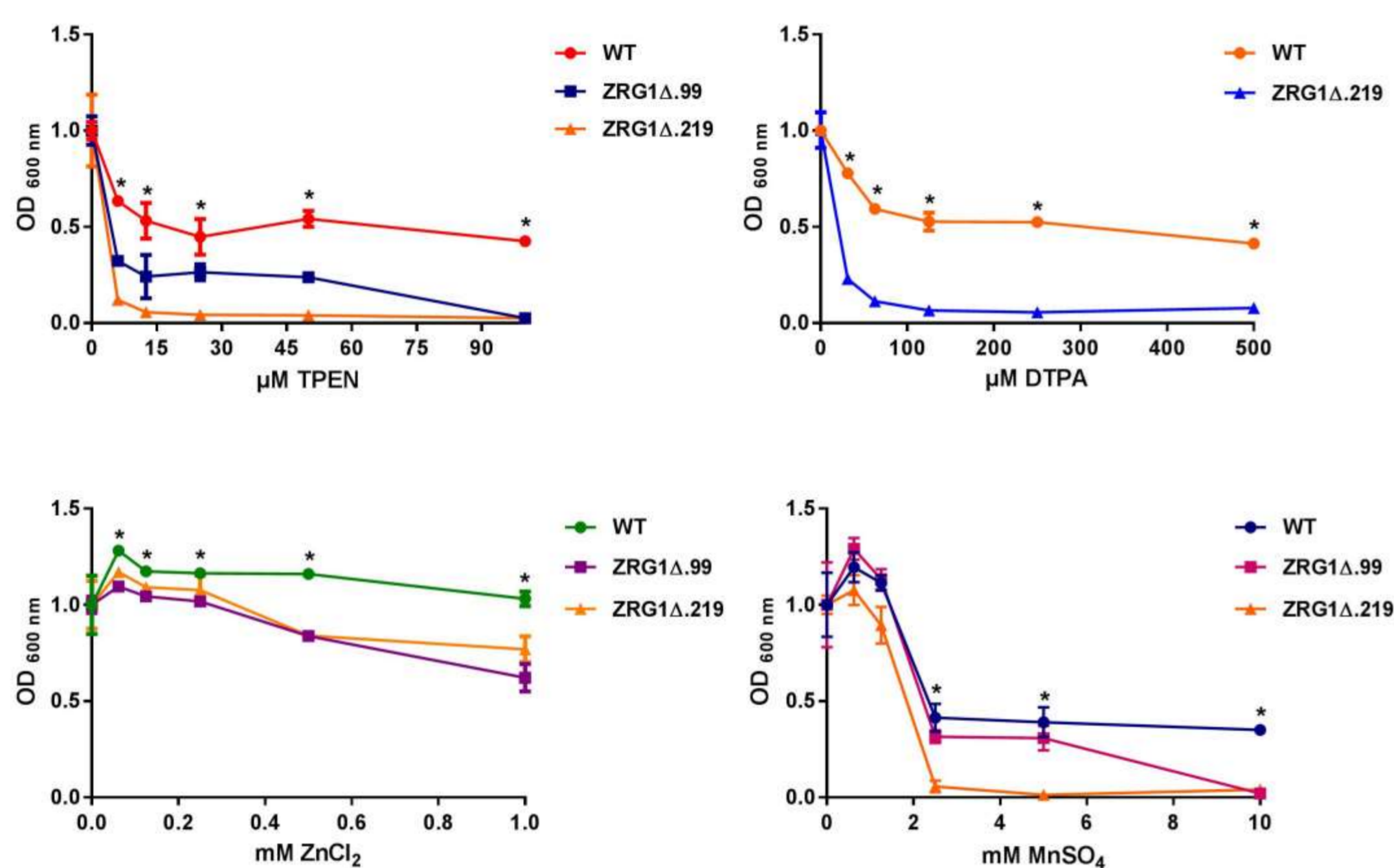


Figura 1: Ensaio de concentração inibitória mínima (MIC) em meio YNB, suplementado com concentrações crescentes de TPEN, DTPA, ZnCl₂ e MnSO₄. Todos os pontos de concentração apresentam um redução de crescimento significativa em relação ao WT para TPEN, DTPA e ZnCl₂. Os resultados representam o valor mais ou menos o desvio padrão de cada condição realizada em triplicata técnica. Análise estatística realizada por *Student t test*. **p*≤0,05.

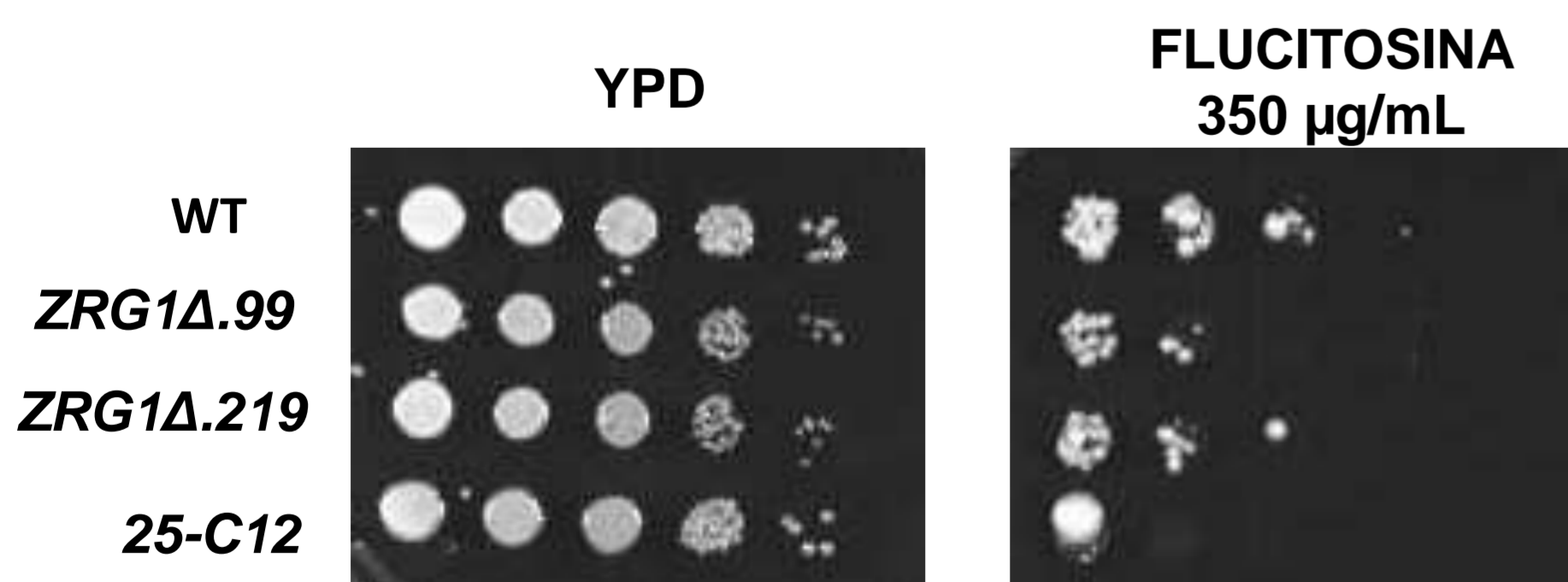


Figura 2: Teste em gotas utilizando diluições de 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ e 10⁷ células/mL. Somente as placas de YPD suplementadas com 350 µg/mL do fármaco Flucitosina apresentaram diferença de crescimento em comparação com a linhagem WT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Park, B. J. *et al.* Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*, 2009.
2. Schneider Rde, O. *et al.* Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. *PLoS One*, 2012.
3. Schneider Rde, O. *et al.* Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. *Scientific Reports*, 2015.
4. Simm, C. *et al.* High-throughput screen for identifying small molecules that target fungal zinc homeostasis. *PLoS One*, 2011.

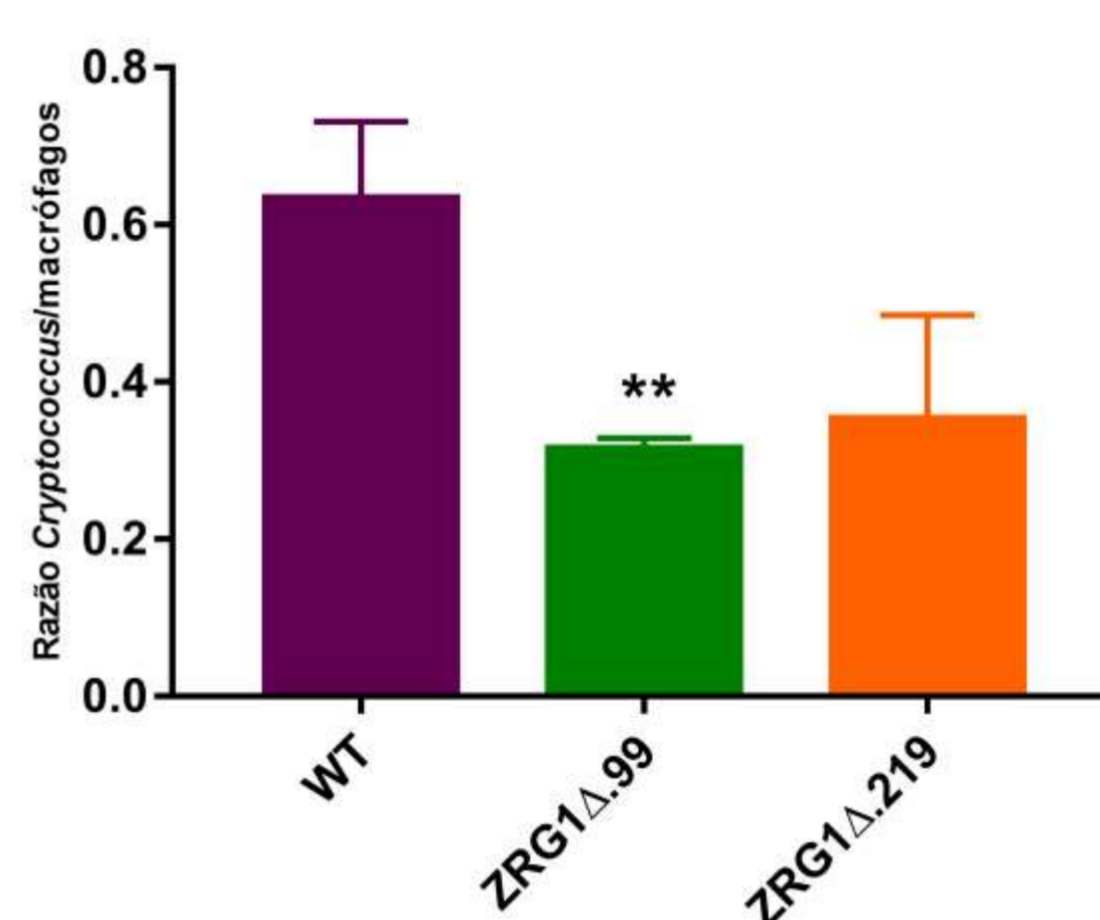


Figura 3: Ensaio de interação entre macrófagos de *Cryptococcus* – *GIEMSA*. A linhagem mutante *ZRG1Δ.99* apresenta redução significativa na fagocitose em relação a linhagem WT. Os resultados representam o valor mais ou menos o desvio padrão de cada condição realizada em triplicata técnica. Análise estatística realizada por *Student t test*. ***p*≤0,01.

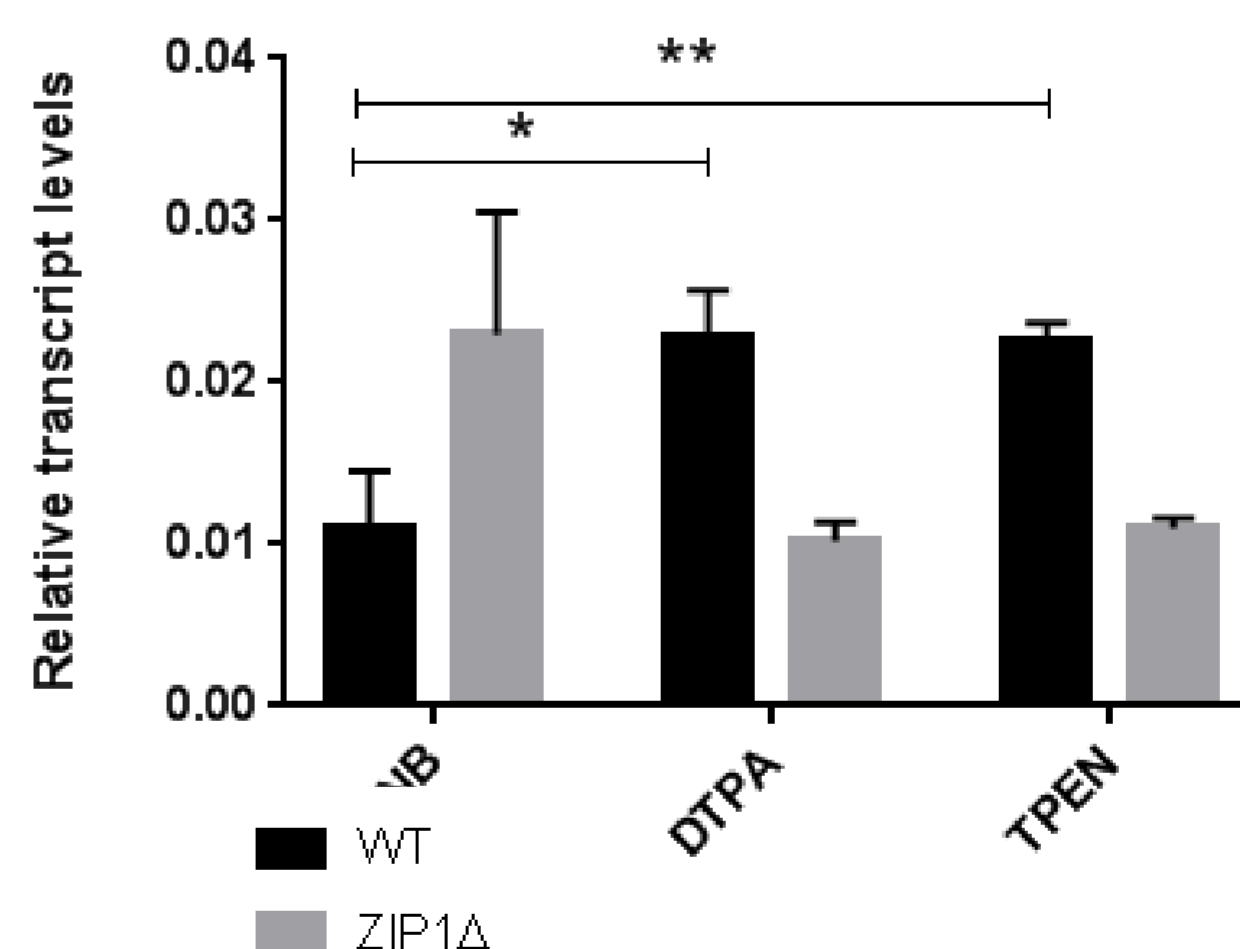


Figura 4: A expressão do gene *ZRG1* foi avaliada por PCR tempo real a partir do RNA extraído dos cultivos de *C. gattii* na condição controle (meio YNB) e condição de privação de metal (com adição dos quelantes DTPA e TPEN). A quantidade relativa de cada transcrito foi normalizada de acordo com os valores de Ct obtidos para os transcritos referentes ao gene normalizador Actina. Os resultados representam o valor mais ou menos o desvio padrão de cada condição realizada em triplicata biológica e triplicata técnica. Análise estatística realizada por *Student t test*. **p*≤0,05; ***p*≤0,01.

CONCLUSÕES

- OS mutantes *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219* apresentam sensibilidade de crescimento em diferentes concentrações de TPEN, DTPA, zinco e manganês. Os níveis de expressão desse gene sofrem um aumento significativo quando células de *C. gattii* WT são cultivadas na presença de quelantes, demonstrando que sua expressão pode ser regulada pela disponibilidade de metais.
- A deleção desse gene parece aumentar a sensibilidade dessas linhagens ao fármaco Flucitosina, demonstrando que esse pode estar envolvido em mecanismos de resposta ao estresse em *C. gattii*.
- Houve redução significativa na fagocitose para a linhagem *ZRG1Δ.99*.