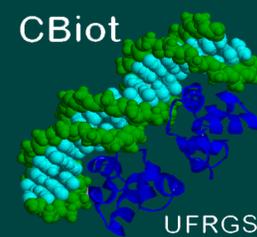




Caracterização funcional dos transcritos T1 e T2 de *AND1* em *Cryptococcus neoformans*.

Julia Sperotto^{1*}, Livia Kmetzsch¹, Augusto Schrank¹.

¹Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.



INTRODUÇÃO

O patógeno *Cryptococcus neoformans* é o principal agente causador de infecções fúngicas que acometem pacientes imunocomprometidos. No Brasil, estima-se que a incidência de criptococose ocorre em torno de 1.000 a 2.500 casos por ano (PRADO et al., 2009). Os determinantes de virulência, como, formação de cápsula polissacarídica, produção de enzimas fosfolipase, ureases, melanina e crescimento a 37°C, são fatores importantes para sua sobrevivência no ambiente hostil do hospedeiro. A infecção acontece por meio da inalação dos esporos da levedura (Figura 1).

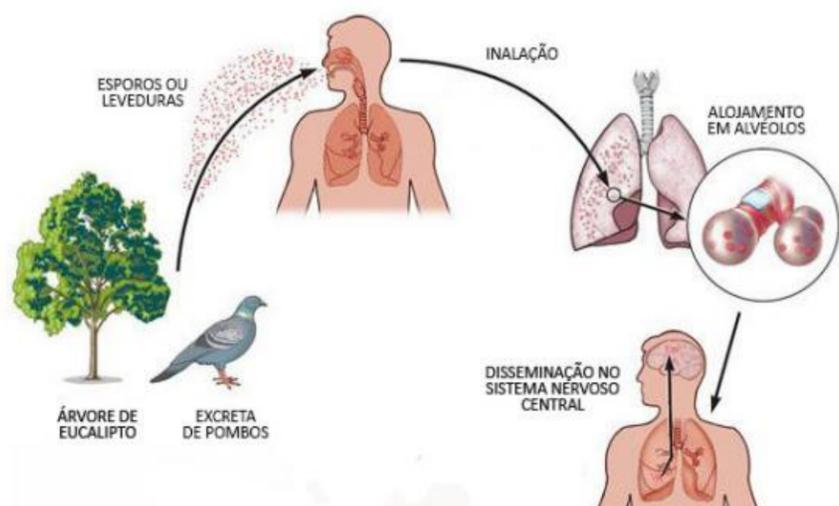


Figura 1: A infecção ocorre pela inalação dos esporos da levedura atingindo, inicialmente, os alvéolos pulmonares, podendo posteriormente alcançar a corrente sanguínea e atravessar a barreira hematoencefálica, infectando o tecido cerebral, e causando um quadro de meningoencefalite criptocócica, frequentemente fatal. Fonte: Adaptado de RAKSHA et al., 2013.

Íons cálcio (Ca^{2+}) são mensageiros intracelulares que participam da via de sinalização mediada por calcineurina (Figura 2), a qual é fundamental para a patogenicidade de *C. neoformans*.

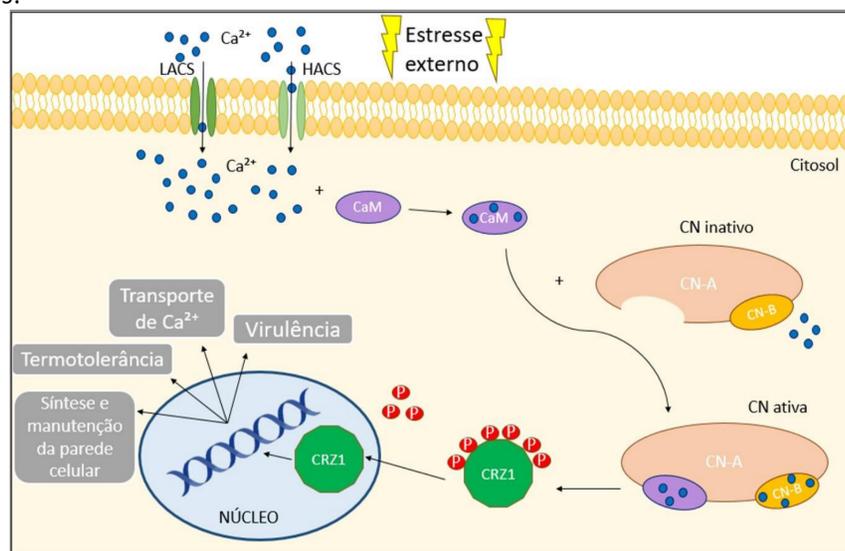


Figura 2: Representação da via de sinalização Ca^{2+} -calcineurina em células de fungos. Quando há a ocorrência de um estresse externo, sistemas de influxo de Ca^{2+} são ativados resultando em um rápido aumento de seus níveis intracelulares. Este aumento na concentração de Ca^{2+} promove a ativação de CaM, que por sua vez permite sua ligação na subunidade A da calcineurina, simultaneamente com a ligação de Ca^{2+} na subunidade B da calcineurina, levando a sua ativação. Calcineurina ativa Crz1, induzindo sua desfosforilação e com isso a translocação para o núcleo. Crz1 regula a expressão de uma série de genes Ca^{2+} -calcineurina dependentes, que vão atuar regulando os níveis intracelulares de Ca^{2+} , a virulência, e genes responsivos ao estresse. CaM: calmodulina; LACS: sistema de influxo de Ca^{2+} de baixa afinidade; HACS: sistema de influxo de Ca^{2+} de alta afinidade.

No intuito de identificar possíveis reguladores ou alvos de calcineurina, o gene *CNAG_03913* foi selecionado. Análises *in silico* revelaram a presença do domínio *AN1-like zinc finger*, sendo então o referido gene denominado *AND1* (*AN1-like zinc finger containing domain*). O gene *AND1* sofre um processo de *splicing* alternativo, levando a produção de duas diferentes moléculas maduras de RNAm a partir do mesmo transcrito, denominados *AND1-T1* e *AND1-T2*.

APOIO

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é caracterizar funcionalmente os transcritos *AND1-T1* e *AND1-T2* do gene *AND1* em *Cryptococcus neoformans*.

MÉTODOS

Para avaliar a participação dos transcritos na via da calcineurina, foi realizada uma análise de RT-qPCR. Células da linhagem H99 foram cultivadas em meio YPD na presença de FK506, um clássico inibidor da via. Em paralelo, está em andamento a construção de duas linhagens de superexpressão, uma para cada transcrito. A obtenção dos fragmentos será por PCR e o vetor utilizado será o pUC18. O método de clonagem para unir os fragmentos ao vetor é denominado *Hot Fusion*, que tem como princípio a junção por regiões homólogas. Após confirmação da construção, o mutante *and1Δ* será transformado por biobalística. As linhagens serão submetidas a testes fenotípicos, em conjunto com linhagens selvagem (H99), mutante (*and1Δ*) e complementada (*and1::AND1*) para caracterização das potenciais funções de cada transcrito.

RESULTADOS

A linhagem mutante nulo *and1Δ* possui uma hipersensibilidade ao agente estressor de parede celular Congo Red (CR) em meio YPD 0,5X a 37°C (Figura 3), sugerindo uma relação com vias de manutenção da osmolaridade, e diferenças na expressão de genes codificadores de quitina sintases *CHS3*, *CHS5* e *CHS8*, quitinase *CHI22* e de *PKC1*, os quais podem ser correlacionados ao fenótipo de hipersensibilidade ao CR.

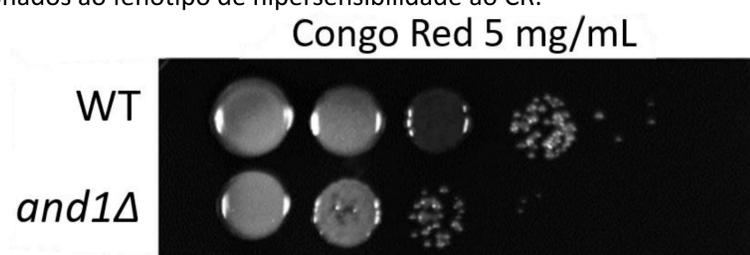


Figura 3: Teste em gota com diluições em série de dez suspensões de células WT (H99) e *and1Δ* que foram cultivadas em meio YPD 0,5X contendo 5 mg/mL de Congo Red, incubadas a 37°C por 48 horas.

Experimentos de RT-qPCR demonstraram níveis de expressão significativamente elevados para o transcrito *AND1-T2* na presença de FK506, sugerindo o envolvimento deste transcrito na via de sinalização mediada por calcineurina. Entretanto, não houve diferença significativa com relação ao transcrito *AND1-T1* na presença e ausência do inibidor.

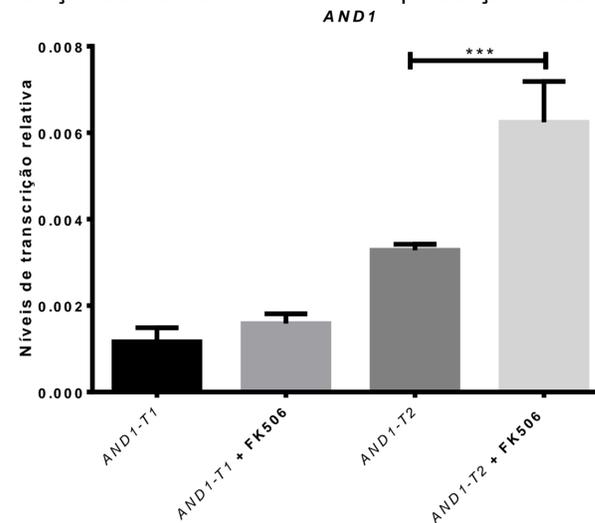


Figura 4: Níveis de expressão dos transcritos *AND1-T1* e *AND1-T2* na linhagem H99, na presença e ausência de FK506.

PERSPECTIVAS

- Construção da linhagem de superexpressão (*and1Δ-P_{H3}-AND1-T1* e *and1Δ-P_{H3}-AND1-T2*).
- Ensaios de avaliação fenotípica com as linhagens mutante (*and1Δ*), complementado (*and1::AND1*) e superexpresso (*and1Δ-P_{H3}-AND1-T1* e *and1Δ-P_{H3}-AND1-T2*).

REFERÊNCIAS