



**Universidade:
presente!**

UFRGS
PROPEAQ



XXXI SIC

21. 25. OUTUBRO • CAMPUS DO VALE

Evento	Salão UFRGS 2019: SIC - XXXI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2019
Local	Campus do Vale - UFRGS
Título	Caraterização funcional dos transcritos T1 e T2 de AND1 em Cryptococcus neoformans
Autor	JULIA SPEROTTO
Orientador	AUGUSTO SCHRANK

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

Julia Sperotto^{1,2} e Augusto Schrank¹

¹Centro de Biotecnologia, UFRGS

² Graduação em Biomedicina, UFCSPA

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. Os determinantes de virulência, como, formação de capsula 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 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. Íons cálcio (Ca²⁺) são mensageiros intracelulares que participam da via de sinalização mediada por calcineurina, a qual é fundamental para a patogenicidade de *C. neoformans*. No intuito de identificar possíveis reguladores ou alvos de calcineurina, o gene *CNAG_03913* foi selecionado. Análises *in silico* revelaram a presença do domínio *ANI-like zinc finger*, sendo então o referido gene denominado *AND1* (*ANI-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*. Resultados de estudos anteriores mostraram que a linhagem mutante nulo *and1Δ* possui uma hipersensibilidade ao agente estressor de parede celular Congo Red (CR) em meio YPD 0,5X, 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. O objetivo deste trabalho é caracterizar funcionalmente cada transcrito do gene *AND1*. Para avaliar a participação dos transcritos (*AND1-T1* e *AND1-T2*) 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. Detectamos níveis de expressão significativamente elevados para o transcrito *AND1-T2* em relação ao *AND1-T1*, sugerindo seu envolvimento deste transcrito nesta via. Em paralelo, está em andamento a construção de duas linhagens de superexpressão, uma para cada transcrito (*and1Δ-P_{H3}-AND1-T1* e *and1Δ-P_{H3}AND1-T2*) em um mutante nulo *and1Δ*. A construção destas linhagens abrange a clonagem da sequência de cada transcrito sob a regulação das sequências promotora e terminadora do gene de histona H3 de *C. neoformans*. Utilizou-se cDNA de *C. neoformans* H99 como molde para a obtenção das sequências dos transcritos *AND1-T1* e *AND1-T2*. Após a amplificação por PCR e purificação dos fragmentos, utilizando o vetor PUC18, previamente clivado, será utilizado o método de clonagem *Hot Fusion* para unir os fragmentos ao vetor, que tem como princípio a junção por regiões homologas. O vetor recombinante gerado será transformado em células de *Escherichia coli*. Após confirmação da construção, células de *C. neoformans and1Δ* serão transformadas por biobalística e selecionadas em meio YPD sólido contendo antibiótico G418. 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.