



Evento	Salão UFRGS 2013: SIC - XXV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2013
Local	Porto Alegre - RS
Título	Análise funcional do gene ATG7 de <i>Cryptococcus neoformans</i> .
Autor	JÚLIA CATARINA VIEIRA REUWSAAT
Orientador	MARILENE HENNING VAINSTEIN

Cryptococcus neoformans é um fungo leveduriforme, encapsulado e o principal agente causador da criptococose. Essa infecção é caracterizada por atingir os pulmões e se disseminar para o sistema nervoso central, causando meningite. Acomete principalmente pacientes imunocomprometidos e estimativas apontam um milhão de casos de infecção por *C. neoformans* no mundo, gerando 620 mil mortes anualmente. Um dos principais mecanismos de sobrevivência do *C. neoformans* em condições de privação de nutrientes durante a infecção é a autofagia. Desse modo, a célula consegue reciclar nutrientes através da digestão de compostos intracelulares, como algumas organelas. No modelo de estudo eucariótico *Saccharomyces cerevisiae*, o mecanismo de formação do autofagossomo já é bem caracterizado. Na formação da estrutura pré-fagossômica, dezoito proteínas Atg são necessárias. Em especial, a proteína Atg7 de *S. cerevisiae* está relacionada na ativação de enzimas relacionadas à ubiquitinação e, juntamente com Atg1, é essencial para o mecanismo de autofagia. *C. neoformans* possui o gene ortólogo ao gene *ATG7* de *S. cerevisiae* e sua função na autofagia ainda não foi caracterizada.

Para a caracterização funcional do gene *ATG7* de *C. neoformans*, foram construídos um mutante nocaute via recombinação homóloga, utilizando-se a marca de resistência a nourseotricina e um mutante complementado, via recombinação ectópica, utilizando-se a marca de resistência a higromicina. Foi realizado um experimento de *Southern Blot* para a confirmação das construções. Aproximadamente 10µg de DNA genômico das linhagens selvagem e mutantes foram clivados com a enzima de restrição *StuI* e a sonda utilizada na hibridização correspondeu a um fragmento de 700pb referente a porção 5' do gene *ATG7*. Após avaliação do padrão de hibridização, verificamos que uma porção do gene *ATG7* havia sido perdida durante a recombinação nas linhagens complementadas de *C. neoformans* e optamos por iniciar uma nova construção.

A partir do DNA genômico da linhagem H99 de *C. neoformans*, o gene que codifica Atg7, de aproximadamente 4477pb, foi amplificado e tratado com as enzimas Klenow e PNK. Em seguida foi realizada a clivagem do vetor pJAF15 com *EcoRV*, tratamento com SAP e ligação do inserto ao vetor, utilizando a enzima T4 DNA ligase. O produto de ligação foi transformado em células quimiocompetentes de *Escherichia coli* e, para confirmar a construção, foi realizado PCR para amplificação do gene e clivagem com as enzimas de restrições *HindIII* e *PvuII*. Posteriormente, realizamos a transformação de células do mutante nulo para o gene *ATG7* de *C. neoformans* com a construção por bombardeamento. As colônias foram selecionadas por resistência a higromicina e, após amplificação dos 4477pb correspondentes ao gene por PCR, selecionamos duas colônias positivas. Para confirmação das construções, será realizado Southern Blot. Após a confirmação das construções, ensaios de infecção experimental em camundongos serão realizados com o intuito de avaliar a participação de Atg7 na virulência de *C. neoformans*.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, autofagia, *ATG7*.