

*Cryptococcus neoformans* é uma levedura encapsulada que causa quadros graves de meningocefalite ou meningite em pacientes imunocomprometidos. Indivíduos com deficiência em células CD4+ são mais acometidos por essa infecção sendo essa responsável por mais de 95% de todos os casos ao redor do mundo.

Proteína de choque térmico 70 (Hsp70) e catalase foram identificadas como proteínas imunogênicas em soros de pacientes com criptococose em estudos prévios do grupo. Existe uma interação entre essas famílias de proteínas e infecções fúngicas, mostrando podem ter uma ação imunoprotetora em modelos animais. Proteínas de choque térmico possuem um importante papel na sobrevivência da célula contra vários fatores estressantes, incluindo efeitos imunomodulatórios em diferentes tipos de doenças. Além disso, foi demonstrado que Hsp70 age como um co-ativador transcricional na expressão da lacase, um importante fator de virulência em *C. neoformans*. Catalase, como Hsp70, está relacionada a estresse celular, catalisando a conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, podendo também ser considerada um fator de virulência.

O objetivo desse trabalho é construir uma quimera HSP70::mCHERRY / CAT::mCHERRY para avaliar a localização celular de ambas as proteínas e também sua interação no decorrer da infecção por *C. neoformans*.

Os genes codificadores para catalase e/ou HSP70 (*Cryptococcus neoformans* var. *grubii* H99) e m-Cherry (plasmídeo pLKB50) foram isolados pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e fusionados por PCR *overlap*. Um fragmento de 6kb foi gerado e clonado em TA Cloning kit PCR 2.1 TOPO vector (Invitrogen). Bactérias *E. coli* quimiocompetentes foram transformadas com HSP70::mCHERRY / CAT::mCHERRY e os plasmídeos de fusão obtidos serão verificados por clivagem com enzimas de restrição e por amplificação por PCR com *primers* específicos.

*C. neoformans* será transformado seguindo o protocolo de biobalística. Os mutantes serão selecionados por resistência a neomicina e a confirmação será realizada por amplificação por PCR e *Southern blot*. A localização das proteínas será realizada por microscopia confocal. Espera-se que os mutantes tenham uma cópia extra dos genes de catalase e/ou HSP70 devido a uma integração ectópica dos plasmídeos, sendo possível a análise de virulência dos mutantes em modelos murinos.