

Júlia Reuwsaat¹, Marilene Henning Vainstein¹.

1- Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS.

Introdução

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 de *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 a 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 e na secreção de polissacarídeos ainda não foi caracterizada. Portanto, o principal objetivo desse estudo é caracterizar o gene *ATG7* de *C. neoformans* através da construção de mutantes nulo e complementado para o gene e analisar sua virulência em modelo murino.

Resultados

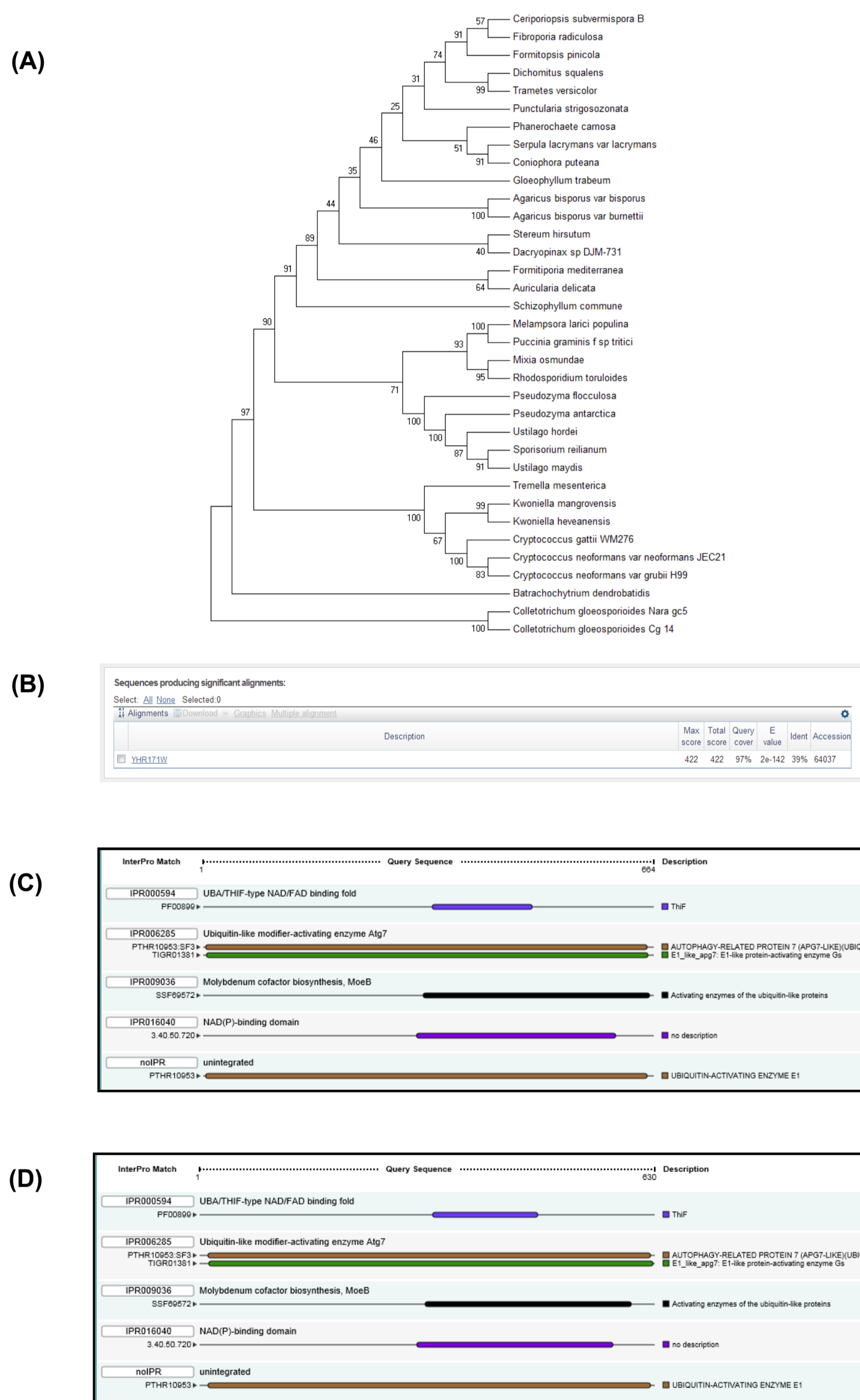


Figura 1. Análises bioinformáticas das sequências da proteína ATG7 de *C. neoformans* e *S. cerevisiae*. (A) Análise filogenética das proteínas ortólogas a ATG7 de *C. neoformans*. Método Neighborhood joining. *C. subvermisporea* B (EMD36648.1), *F. radiculosa* (CCM07128.1), *F. pinicola* (EPT02229.1), *D. squalens* (EJF57022.1), *T. versicolor* (EIW51911.1), *P. strigosozonata* (EIN14748.1), *P. carmosa* (EKM57005.1), *S. lacrymans* var *lacrymans* (EGO00864.1), *C. puteana* (EIW75651.1), *G. trabeum* (EPQ50461.1), *A. bisporus* var *bisporus* (EKV44890.1), *A. bisporus* var *burnettii* (EKM74815.1), *S. hirsutum* (EIM81342.1), *F. mediterranea* (EJD01962.1), *A. delicata* (EJD47542.1), *D. sp. DJM-731* (EJU01568.1), *S. commune* (XP_003029468.1), *M. larici populina* (EGG00390.1), *P. graminis f. sp. tritici* (XP_003326060.1), *M. osmundae* (GAA94304.1), *R. toruloides* (EMS22343.1), *P. floculosa* (EPQ27972.1), *P. antarctica* (GAC77346.1), *U. hordei* (CCF49351.1), *S. reilianum* (CBQ69836.1), *U. maydis* (XP_761027.1), *T. mesenterica* (EIW68710.1), *K. mangrovensis* (CCM73225.1), *K. heveanensis* (ACZ81462.1), *C. gattii* WM276 (XP_003195554.1), *C. neoformans* var *neoformans* JEC21 (XP_572740.1), *C. neoformans* var *grubii* H99 (AFR97257.2), *B. dendrobatidis* (EGF82859.1), *C. gloeosporioides* Nara gc5 (ELA37293.1), *C. gloeosporioides* Cg 14 (EQB55638.1). (B) BLAST entre as sequências proteicas de ATG7 de *C. neoformans* (query) e *S. cerevisiae* (subject). Análise de domínios conservados da proteína ATG7 de (C) *C. neoformans* e (D) *S. cerevisiae*. Mesmo com baixa identidade de sequência proteica (39%), ambas proteínas ATG7 apresentam os mesmos domínios conservados.

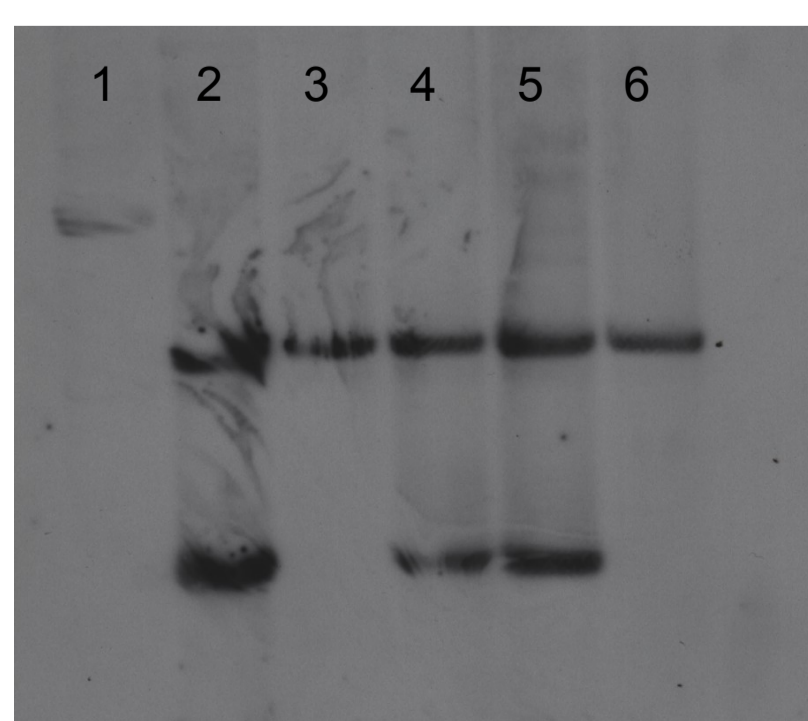


Figura 2. Southern blot das primeiras construções das linhagens mutantes para o gene ATG7 de *C. neoformans*. O DNA genômico de cada linhagem foi clivado com a enzima de restrição *Stu*I e hibridizado com uma sonda de 700pb correspondente a região 5' do gene. 1, DNA genômico H99. 2, Δ atg7.1. 3, Δ atg7.2. 4, atg7.1::ATG7.1. 5, atg7.2::ATG7.2. 6, Δ atg7 Δ grasp. Grasp é uma proteína do complexo de Golgi envolvida no processo de secreção. A linhagem 2 (Δ atg7.1) foi descartada pois não teve o gene deletado e as linhagens 4 e 5 foram descartadas pois houve a perda de uma porção do gene ATG7 no momento da complementação. Assim, uma nova tentativa de complementação de ATG7 foi realizada.

Após a análise confirmatória da construção dos mutantes complementados para o gene ATG7 (Figura 2) e a descoberta da ausência da porção 3' na complementação, o primeiro passo foi a reconstrução deste mutante complementado. Para isso, a sequência de 4477pb, correspondente a região codificante acrescida de 1000pb a jusante e a montante, foi amplificada por PCR, purificada e tratada com as enzimas Klenow e PNK para clivar as adenosinas nas extremidades da sequência e fosforilar as extremidades, respectivamente. O vetor utilizado para a construção do mutante complementado foi o pJAF15, o qual contém uma marca de seleção a higromicina. Ele foi clivado com a enzima *EcoRV*, e tratado com a enzima SAP para defosforilação. A reação de ligação foi realizada com a enzima T4 DNA ligase.

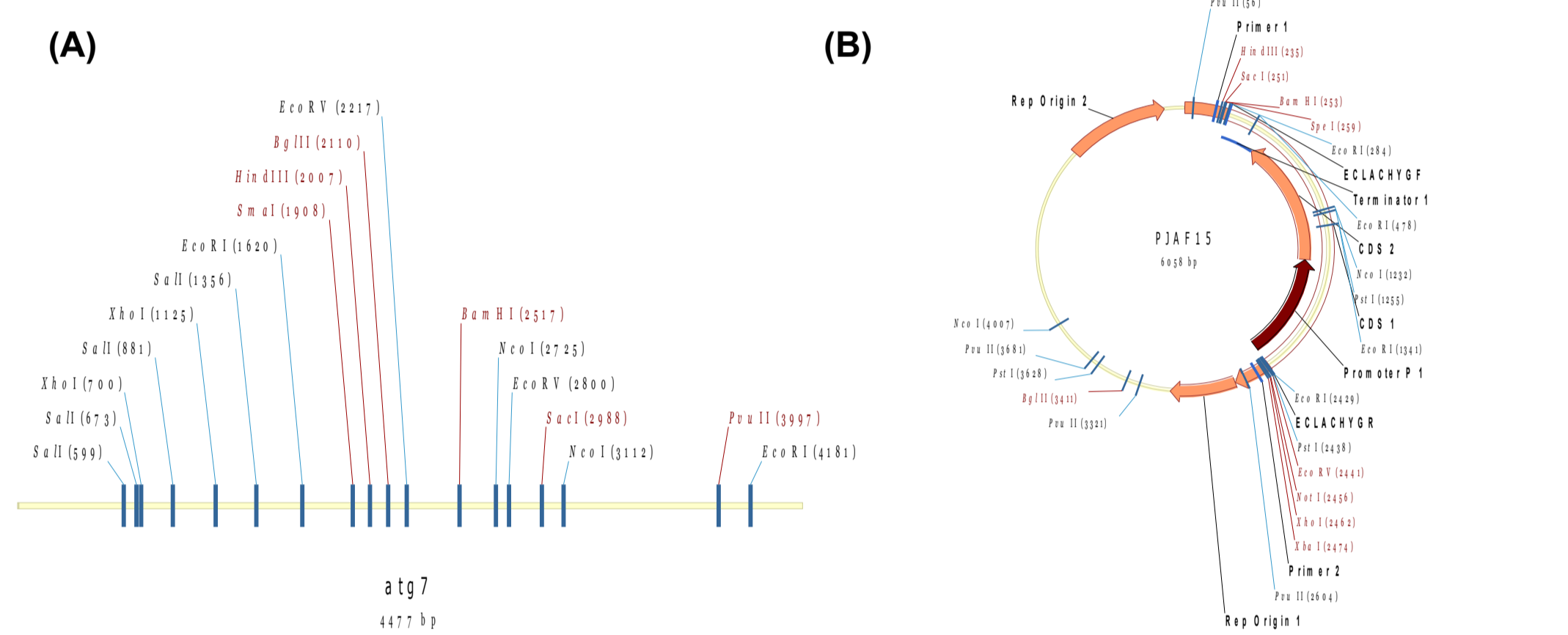


Figura 3. Sequência referente ao gene ATG7 e vetor pJAF15 para bombardeamento em *C. neoformans*. (A) Sequência gênica de 4477pb contendo a região codificante da proteína Atg7 e regiões regulatórias (1000 pares de base a montante e a jusante da região codificadora). (B) Mapa do vetor pJAF15 para clonagem do inserto e bombardeamento.

Após a ligação, células quimiocombentes de *E. coli* TG2 foram transformadas com o vetor. Foi realizado PCR de colônia e apenas 2 colônias foram positivas. Posteriormente, o plasmídeo foi extraído das células de *E. coli*, e foram realizados PCRs com primers que amplificam uma porção de 120pb do gene e o gene ATG7 completo. Além disso, foram realizadas duas clivagens confirmatórias, com as enzimas *Hind*III e *Pvu*II (Figura 4).

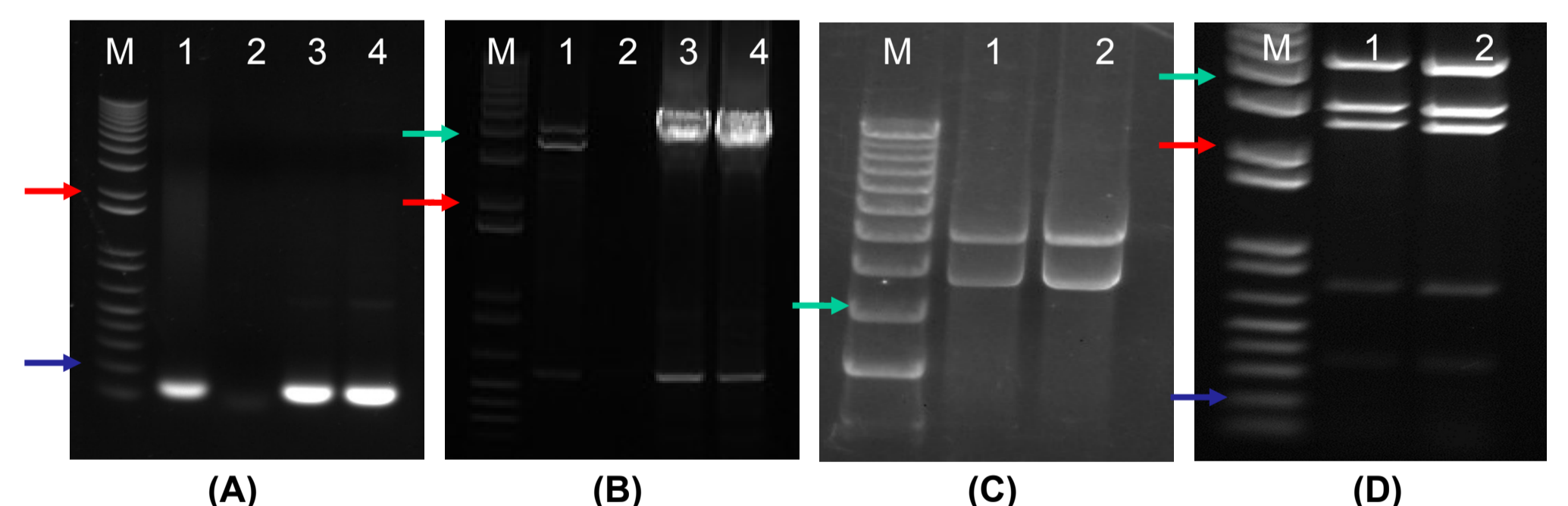


Figura 4. Confirmação da construção do vetor. (A) PCR com primers que amplificam uma porção de 120pb do gene ATG7. M, marcador de tamanho molecular. 1, controle positivo DNA genômico de *C. neoformans* H99. 2, controle negativo. 3, colônia 2. 4, colônia 5. (B) PCR com primers que amplificam o gene ATG7 completo (4477pb). M, 1, 2, 3, e 4, mesma marcação do item A. (C) clivagem do plasmídeo com a enzima de restrição *Hind*III. M, marcador de tamanho molecular. 1, colônia 2; 2, colônia 5. O gene foi inserido no vetor, gerando fragmentos de 4676pb e 5859pb. (D) clivagem do plasmídeo com a enzima de restrição *Pvu*II. M, 1, 2, mesma marcação do item C. Confirmação da inserção do gene, gerando fragmentos de 360pb, 717pb, 2433pb, 2865pb e 4159pb. Setas vermelhas indicam marcador de 2kb, verde de 4kb e azuis 0,2kb.

Após a confirmação da construção do vetor, foi realizado o bombardeamento do vetor em células do mutante nulo para o gene ATG7 de *C. neoformans*. DNA genômico foi extraído, foi realizado um PCR com os mesmos primers utilizados anteriormente e apenas duas colônias foram positivas. Posteriormente, foi realizado um Southern blot e um RT-PCR, para confirmação da deleção e complementação do gene ATG7 em *C. neoformans*.

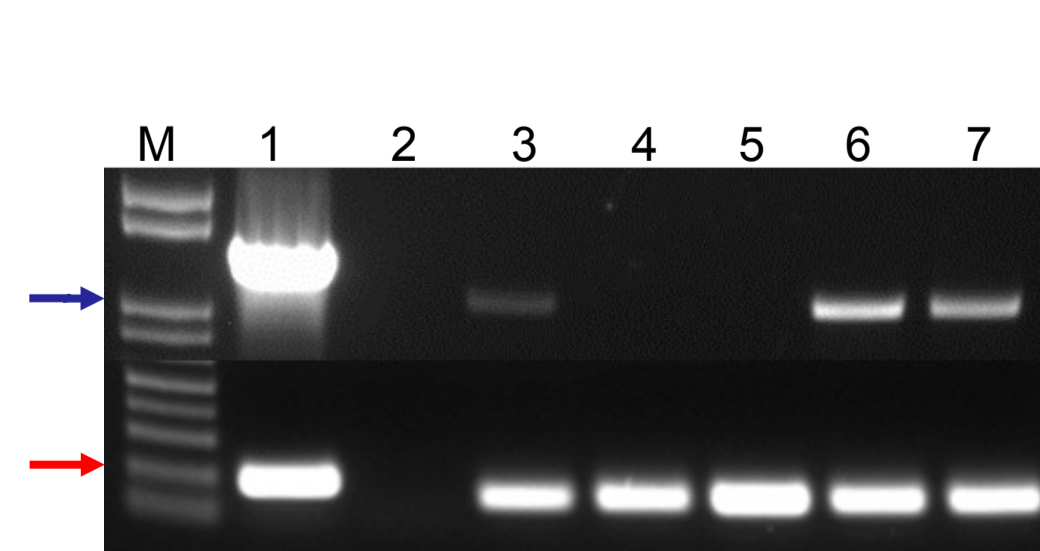


Figura 5. RT-PCR das linhagens mutantes para ATG7. Foi extraído RNA total das células dos mutantes de *C. neoformans* e sintetizado cDNA, o qual foi utilizado como molde no PCR. Painel superior: foi utilizado um conjunto de primers que amplificam 1kb do gene ATG7. M, marcador de tamanho molecular. 1, controle positivo com DNA genômico de H99. 2, controle negativo. 3, cDNA do WT H99. 4, cDNA Δ atg7. 5, cDNA Δ atg7 Δ grasp. 6, cDNA atg7::ATG7. 7, cDNA atg7::ATG7. 8. Painel inferior: controle com primers de actina. Setas azul indica marcador de 1kb e vermelha de 0,2kb.