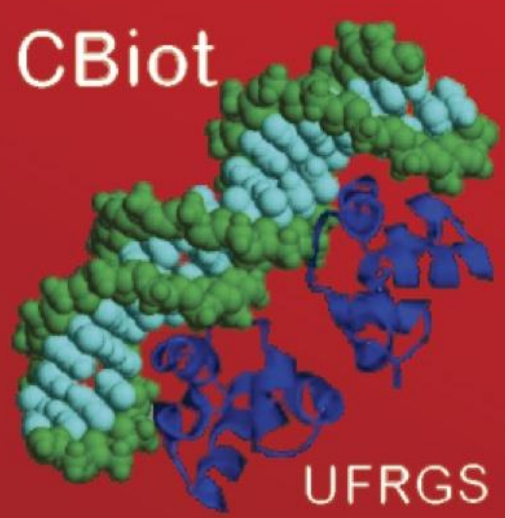


Análise da expressão de genes envolvidos na homeostase de metais em *Cryptococcus gattii*



Camila Diehl da Rosa¹, Charley Christian Staats^{1,2}.

¹ Centro de Biotecnologia e ² Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia - Instituto de Biociências, UFRGS.



INTRODUÇÃO

Uma importante patologia que acomete pacientes imunocomprometidos é a criptococose¹, que tem como principais agentes etiológicos as leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Ao passo que *C. neoformans* é considerado um patógeno oportunista, *C. gattii* é um patógeno primário capaz de causar doença em hospedeiros imunocompetentes^{2,3}. Para conter um processo infeccioso, o hospedeiro pode diminuir a biodisponibilidade de alguns nutrientes, como glicose, ferro e zinco, para dificultar o desenvolvimento de micro-organismos, sendo essa limitação imposta pelo hospedeiro conhecida como imunidade nutricional⁴. Recentemente, foi mostrado por nosso grupo que o adequado metabolismo de zinco em *C. gattii* é fundamental para o seu potencial infectivo⁵. Ainda, dados ainda não publicados revelam que a proteína codificada pelo gene *ZIP1*, possível transportador de zinco, participa ativamente no desenvolvimento de *C. gattii* em condições de privação deste metal. Além disso, a expressão dos genes codificadores para as proteínas transportadoras de metais *Zip1* e *Zip2*, possuem sua expressão regulada pela disponibilidade de zinco, tendo altos níveis de transcritos quando células de *C. gattii* são submetidas ao cultivo de privação de zinco. Frente ao papel essencial do zinco, torna-se necessário o maior conhecimento do metabolismo desse metal, como promissor alvo para novas estratégias de tratamentos a infecções causadas por *C. gattii*. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a modulação da homeostase do metal zinco em *C. gattii* e a sua influência na atividade antifúngica de macrófagos, bem como a caracterização de alguns genes envolvidos no metabolismo desse metal.

RESULTADOS

Para analisar se a expressão dos genes *ZIP1*, *ZIP2* e *ZIP3* é influenciada pela disponibilidade ou privação de zinco e se a expressão de algum desses genes responde de maneira mais específica a este metal, foi realizado o cultivo da linhagem R265 nas condições controle (meio YNB), privação de zinco (adição de 100 μ M de quelante DTPA - ácido dietileno triamino pentaacético) e condições com 100 μ M de quelante DTPA, suplementado ou não com 400 μ M de $ZnCl_2$ ou de $FeCl_2$ no meio de cultivo. Foi observado, a partir de análises de PCR tempo real, um aumento dos níveis relativos de transcritos quando as células de R265 selvagem foram cultivadas na condição de privação de zinco para os genes *ZIP1* ($p \leq 0,05$) (Figura 1) em relação à condição controle. Os níveis de expressão de *ZIP1* mostraram redução significativa quando foi adicionado $ZnCl_2$ ao meio contendo quelante DTPA ($p \leq 0,05$), mas não houve redução significativa nos níveis de expressão quando adicionamos $FeCl_2$ ao meio de cultivo nas mesmas condições (Figura 1), sugerindo que a proteína codificada pelo gene *ZIP1* seja um transportador de alta afinidade.

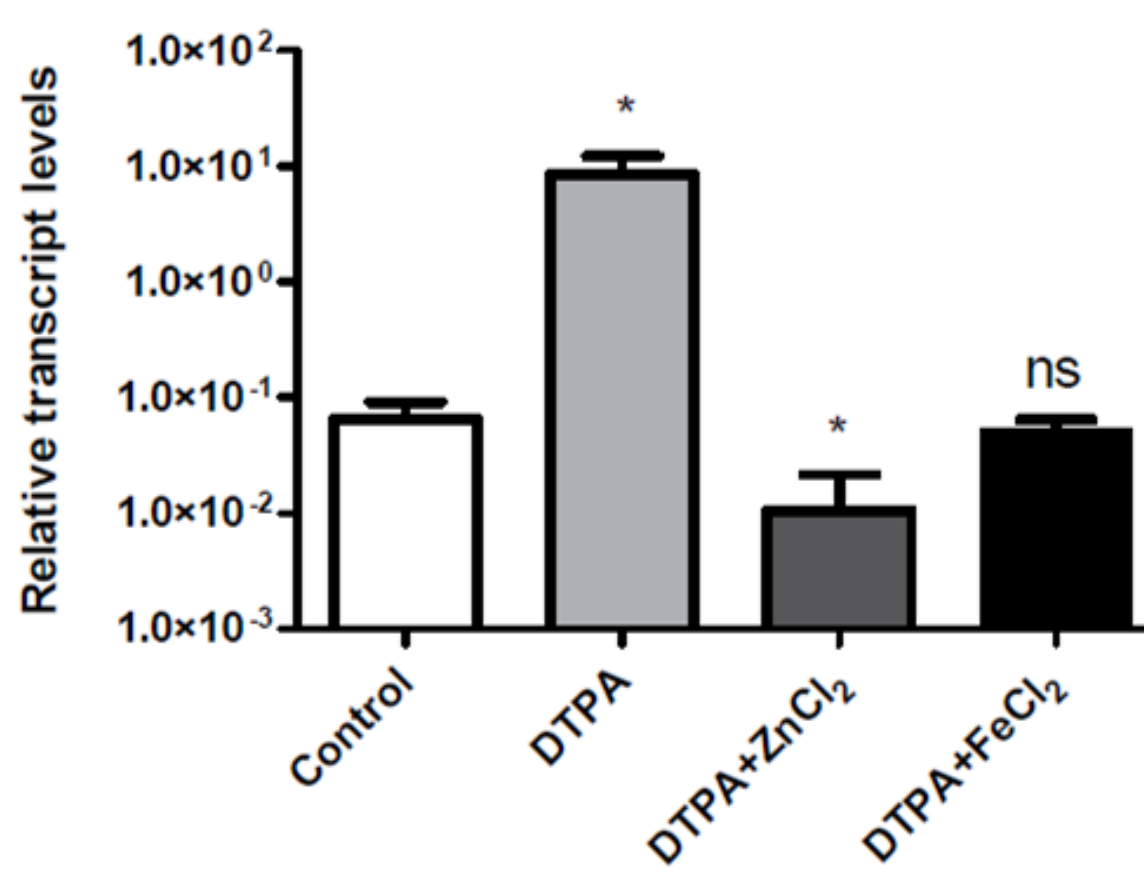


Figura 1: O cultivo na condição de privação de zinco aumenta a expressão do gene ZIP1. A expressão do gene *ZIP1* foi avaliada por PCR tempo real a partir do RNA extraído dos cultivos de *C. gattii* na condição controle, privação de zinco e meio suplementado com $ZnCl_2$ ou $FeCl_2$. Os resultados representam o valor e o desvio padrão de cada condição realizada em triplicata biológica e triplicata técnica. A quantidade relativa de cada transcrito foi normalizada de acordo com os valores de Ct obtidos para os transcritos referentes ao gene normalizador Actina. Análise estatística realizada por Student t test. (*) $p \leq 0,05$.

Dados não publicados de nosso grupo revelaram que linhagens com inativação sítio-dirigida do gene *ZIP1* apresentam mais sensibilidade à privação de zinco em relação à linhagem selvagem, fato não observado pela linhagens com inativação sítio-dirigida do gene *ZIP2*. Para analisar se há um efeito compensatório na ausência do gene *ZIP2* pelo aumento da expressão do gene *ZIP1*, foi realizado o cultivo da linhagem R265 na condição controle e privação de zinco, utilizando o quelante DTPA. Além do cultivo da linhagem selvagem, foi realizado o cultivo da linhagem mutante para o gene *ZIP2* (*zip2Δ*) nas mesmas condições, por um período de duas horas. Quando analisamos a ocorrência de um efeito compensatório na ausência do gene *ZIP2*, foi observado um aumento significativo na expressão do gene *ZIP1* ($p \leq 0,001$) na linhagem *zip2Δ*, demonstrando que ocorre uma provável compensação da deleção do gene *ZIP2* nessa linhagem (Figura 2).

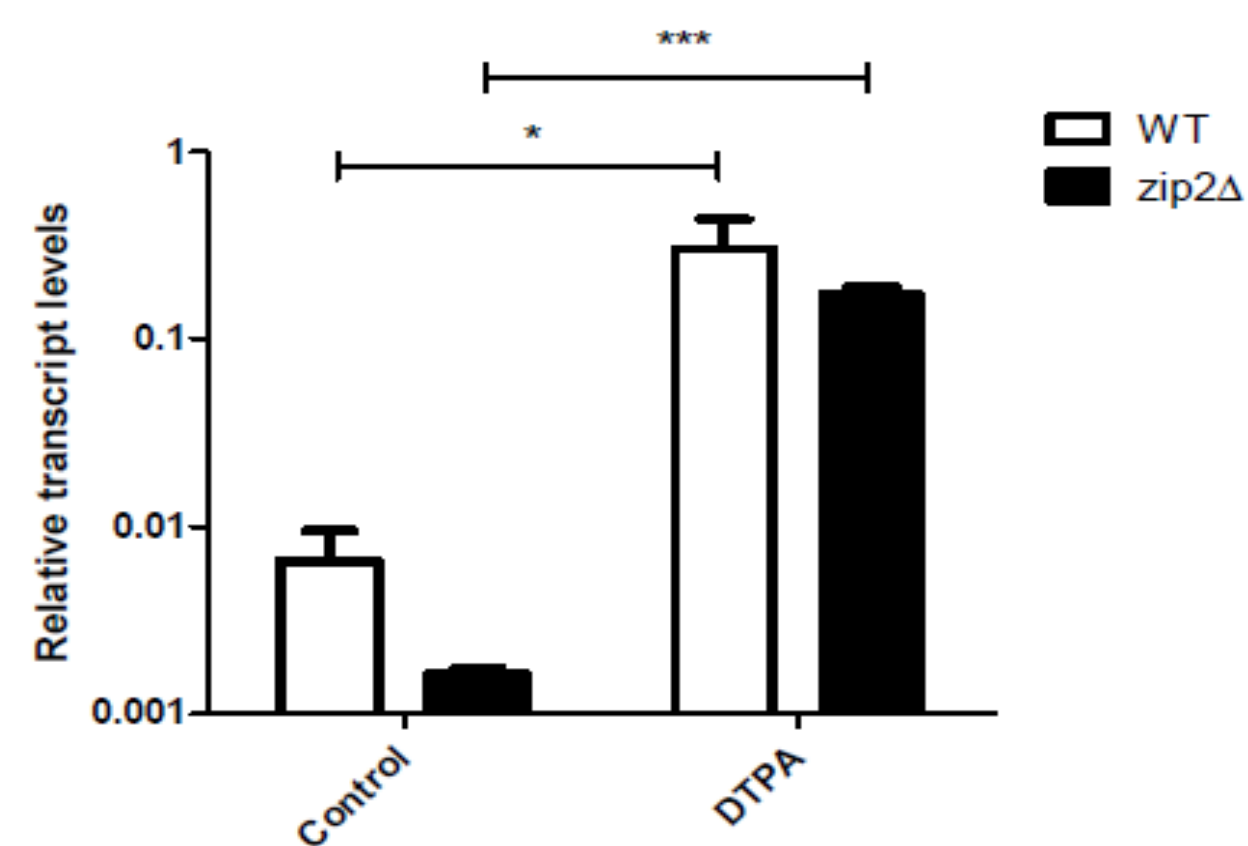


Figura 2: A deleção de ZIP2 ocasiona uma regulação positiva do gene ZIP1. A expressão do gene *ZIP1* foi avaliada por PCR tempo real a partir do RNA extraído dos cultivos de *C. gattii* na condição controle e de privação de zinco. Os resultados representam o valor mais ou menos o desvio padrão de cada condição realizada em triplicata biológica e triplicata técnica. A quantidade relativa de cada transcrito foi normalizada de acordo com os valores de Ct obtidos para os transcritos referentes ao gene normalizador Actina. Análise estatística realizada por Student t test. (*) $p \leq 0,05$ (***) $p \leq 0,001$.

CONCLUSÕES

As proteínas codificadas pelos genes *ZIP1* e *ZIP2* são conhecidos transportadores de metais, que participam ativamente da captação de íons na célula. Esses genes tem sua expressão regulada pela disponibilidade de zinco. Além disso, para os mutantes com deleção no gene *ZIP2*, o qual se acredita também estar relacionado com o transporte de zinco e outros metais em *C. gattii*, um efeito compensatório com a alta expressão do gene *ZIP1* é observado, que pode explicar o crescimento normal dessa linhagem na condição de privação de zinco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Perfect JR (2012) The triple threat of cryptococcosis: it's the body site, the strain, and/or the host. *MBio* 3:doi: 10.1128/mBio.00165-12
2. Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A (1999) *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J. Clin. Microbiol.*37: 838-84.
3. Steenbergen JN, Casadevall A (2000) Prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotype D) and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A) isolates in New York City. *J. Clin. Microbiol.*38:1974-1976.
4. Cassat JE, Skaar EP (2012) Metal ion acquisition in *Staphylococcus aureus*: overcoming nutritional immunity. *Semin Immunopathol*34:215-235. doi: 10.1007/s00281-011-0294-4
5. Schneider ReO, Fogaça NeS, Kmetzsch L, Schrank A, Vainstein MH, Staats CC (2012) Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. *PLoS One* 7:e43773. doi: 10.1371/journal.pone.0043773