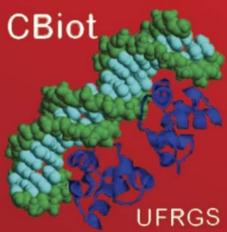


Caracterização funcional de transportadores de zinco de *Cryptococcus gattii*

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 de etiologia fúngica é a criptococose¹, ocasionada pelas leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Recentemente, foi mostrado por nosso grupo que o adequado metabolismo de zinco em *C. gattii* é fundamental para o seu potencial infeccioso². As proteínas codificadas pelos genes *ZIP1* e *ZIP2*, transportadoras deste metal, participam ativamente no desenvolvimento de *C. gattii* em condições de privação de zinco, ocasionada pela adição do quelante de baixa afinidade BPDS. Neste contexto, a expressão destes transportadores pode ser regulada quando células de *C. gattii* são submetidas ao cultivo de privação de metais. Frente ao papel essencial do zinco, torna-se necessário o maior conhecimento do metabolismo desse metal. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a modulação da homeostase do metal zinco em *C. gattii*, pela caracterização funcional de genes transportadores deste metal.

METODOLOGIA E RESULTADOS

Este trabalho foi realizado utilizando mutantes nulos de *C. gattii* para os transportadores de zinco da família ZIP codificados pelos genes *ZIP1* e *ZIP2*, assim como o mutante duplo para os genes *ZIP1* e *ZIP2*³.

Para avaliar se estas linhagens apresentavam menores quantidades de zinco intracelular, realizamos ensaios empregando o agente ditizona, capaz de corar as colônias fúngicas de vermelho de acordo com a quantidade de zinco nas células. As células da linhagem R265 WT, mutantes e mutantes complementados, foram cultivadas em meio YNB, YNB com adição de 100 µM de quelante DTPA e YNB com adição de 100 µM de ZnCl₂ e colocadas posteriormente em contato com o agente ditizona. Foi observada coloração em todas as linhagens quando cultivadas em meio YNB com adição de ZnCl₂, ao passo que esta coloração foi ausente no cultivo em YNB+DTPA. O cultivo em YNB levou à formação de coloração vermelha apenas nas linhagens WT, mutante para o gene *ZIP2* (*zip2Δ*), assim como para os mutantes complementados dos genes *ZIP2* e *ZIP1*, confirmando que mutantes para o gene *ZIP1* possuem menores concentrações intracelulares de zinco (Fig. 1).

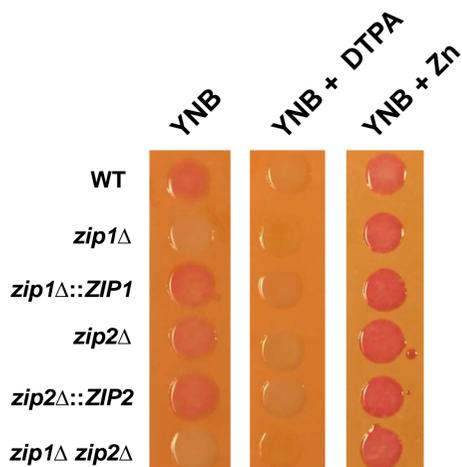


Figura 1: Mutantes do gene *ZIP1* apresentam menores níveis intracelulares de zinco. Análise pelo método de ditizona das concentrações intracelulares de zinco nas linhagens cultivadas em YNB, YNB acrescido de DTPA (100 µM) ou YNB acrescido de zinco (100 µM).

Para analisar se a expressão dos genes *ZIP1*, *ZIP2* e *ZIP3* são influenciadas pela disponibilidade ou privação de zinco e se a expressão de algum desses genes responde de maneira mais específica a este metal, foram realizados ensaios de expressão gênica destes genes. Para tanto, foi extraído RNA de cultivos da linhagem WT em condições controle (meio YNB), privação de zinco (adição de 100 µM de quelante DTPA), condições com 100 µM de quelante DTPA suplementado com 400 µM de ZnCl₂ ou 400 µM de FeCl₃ e condições de YNB suplementado com 400 µM de ZnCl₂ ou 400 µM de FeCl₃. Todas as análises de expressão foram realizadas empregando *Real Time PCR*.

CONCLUSÕES

A disponibilidade de metais altera a expressão dos genes da família ZIP em *C. gattii*. ZIP1 parece ser o principal transportador de zinco em *C. gattii*.

Um aumento dos níveis relativos de transcrito foi detectado quando as células foram cultivadas na condição de privação de zinco para os genes *ZIP1* ($p < 0,05$) (Fig. 2A), *ZIP2* ($p < 0,01$) (Fig. 2B) e *ZIP3* ($p \leq 0,001$) (Fig. 2C) em relação à condição controle. Os níveis de expressão de *ZIP1* mostraram redução significativa quando adicionado ZnCl₂ ao meio contendo quelante DTPA ($p < 0,05$), assim como quando adicionado FeCl₃ (Fig. 2A). A adição de 400 µM de ZnCl₂ ou FeCl₃ no cultivo não alterou de forma significativa os níveis relativos de transcrito em relação à condição controle, confirmando que esta diminuição decorrente da adição de metais no meio de cultivo contendo quelante DTPA é devido a disponibilidade do metal e não a saturação do quelante.

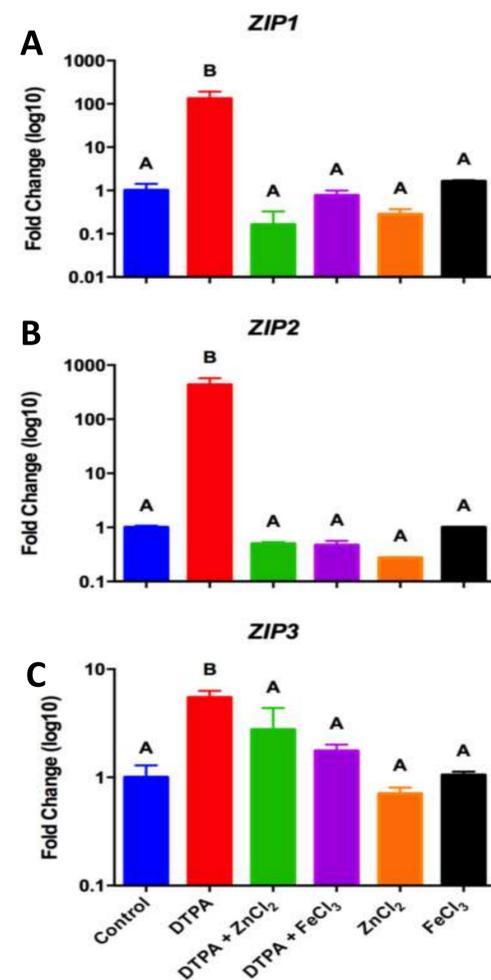


Figura 2: A disponibilidade de metal influencia a expressão dos genes *ZIP1*, *ZIP2* e *ZIP3*. A expressão dos genes *ZIP1* (A), *ZIP2* (B) e *ZIP3* (C) foi avaliada por PCR tempo real a partir do RNA extraído dos cultivos de *C. gattii* na condição controle (meio YNB), condição de privação de metal (com adição do quelante DTPA) e condições de meio com adição do quelante DTPA suplementado com zinco ou ferro. A quantidade relativa de cada transcrito foi normalizada de acordo com os valores de Ct obtidos para os transcritos referentes ao gene normalizador Actina. Os resultados representam o valor mais ou menos o desvio padrão de cada condição realizada em triplicata biológica e triplicata técnica. Análise estatística realizada por Anova.

REFERÊNCIAS

- 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
- 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
- Schneider ReO, Diehl C, dos Santos FM, Piffer AC, Garcia AWA, Kulmann MIR, Schrank A, Kmetzsch L, Vainstein MH, Staats CC (2015). Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. Scientific Reports, v. 5, p. 10104