

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Carolina Farias Stadkowiiski

CRISPR COMO FERRAMENTA PARA EDIÇÃO GÊNICA EM *Cryptococcus gattii*

Porto Alegre
2024

Carolina Farias Stadkowiiski

CRISPR COMO FERRAMENTA PARA EDIÇÃO GÊNICA EM *Cryptococcus gattii*

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

Co-orientador: Dr. Igor Daniel Alves Ribeiro

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Stadkowiski, Carolina Farias
CRISPR COMO FERRAMENTA PARA EDIÇÃO GÊNICA EM
Cryptococcus gattii / Carolina Farias Stadkowiski. --
2024.
43 f.
Orientador: Charley Christian Staats.

Coorientador: Igor Daniel Alves Ribeiro.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Cryptococcus. 2. Mutantes nulos. 3.
Complementação gênica. 4. CRISPR. I. Staats, Charley
Christian, orient. II. Ribeiro, Igor Daniel Alves,
coorient. III. Título.

Carolina Farias Stadkowiiski

CRISPR COMO FERRAMENTA PARA EDIÇÃO GÊNICA EM *Cryptococcus gattii*

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: 23 de fevereiro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Heryk Motta de Souza - UFRGS

Julia Catarina Reuwsaat - UFRGS

Charley Christian Staats - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós, Luiz e Marilene, por todo apoio e incentivo, na vida e nos estudos, sem o apoio deles nada disso seria possível.

A minha mãe, por todo amor e ensinamentos que me fizeram ser a pessoa que sou hoje.

Ao meu pai, por sempre se fazer presente, pelo apoio, por todos ensinamentos e momentos de descontração que foram essenciais para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu irmão, Thiago, pela companhia e por tantas risadas boas.

Ao meu cachorro, Snoopy, por alegrar meus dias e pela companhia fiel desde o início da graduação, mesmo que fosse dormindo próximo de mim enquanto eu passava horas estudando ou assistindo às aulas.

Aos meus amigos por me acompanharem em tantos rolês e fazerem muitas vezes com que essa fase da minha vida se tornasse bem mais leve.

Aos colegas do laboratório 219 por serem além de apenas colegas mas também amigos, por todos (e foram muitos) momentos de descontração, por terem me recebido tão bem e por todo aprendizado compartilhado.

Aos demais colegas dos laboratórios 222, 220 e 217 por todos os conhecimentos compartilhados e pela disposição de sempre me ajudar sanando as minhas milhares de dúvidas.

Ao meu coorientador Igor, pela paciência de me ensinar e repetir tantas vezes até que eu pudesse compreender e também por compartilhar tantos momentos de descontração.

Ao meu orientador Charley, por ter me aceitado em seu laboratório, por todo conhecimento passado e pela paciência e disposição de sempre, para me ensinar e tirar minhas dúvidas.



RESUMO

Fungos do gênero *Cryptococcus*, como *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, são geralmente considerados patógenos oportunistas, principais causadores de meningoencefalite em humanos. A doença, conhecida como criptococose, tem como via principal de aquisição a inalação de leveduras dessecadas ou esporos encontrados no ambiente ou em excretas de aves, tendo como alvo primário da infecção o trato respiratório. Devido ao elevado número de casos que evoluem para óbito associados a esta doença, que teve seu auge influenciado pela epidemia de HIV/AIDS, muitos estudos foram desenvolvidos com a finalidade de compreender os mecanismos envolvidos na patogenicidade destes microrganismos e descobrir novos alvos terapêuticos para esta enfermidade. O estudo de genes e caracterização de determinantes de virulência é desenvolvido por meio de técnicas como construção de mutantes nulos e complementação gênica. Com o intuito de gerar a complementação de mutantes nulos se faz necessária a busca por métodos eficientes de edição gênica, para que se evite a integração ectópica que seria um grande entrave na análise da influência dos genes no fenótipo da doença. Sendo assim, a utilização de um sistema que gera uma quebra dupla guiada em um local específico do DNA, permite aumentar as chances de correta integração de um gene exógeno no material genético do organismo alvo de estudos. Baseado no sistema imune adaptativo de procariotos, o sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) é amplamente utilizado na geração de mutações genéticas. Para a utilização desse sistema foi realizada a construção de seus componentes principais, um cassete de expressão de uma marca de seleção como DNA doador, um cassete de expressão transitória do RNA guia (gRNA) e um cassete de expressão da enzima endonuclease Cas9, para que pudéssemos transformar as células fúngicas. Foram realizadas a construção dos componentes necessários e a transformação das células de *C. gattii* através de biolística, embora não alcançadas colônias transformantes, foi possível reproduzir de forma rápida e eficiente a construção dos componentes essenciais para a utilização do sistema CRISPR.

Palavras-chave: *Cryptococcus*; mutantes nulos; complementação gênica; CRISPR.

ABSTRACT

Fungi of the *Cryptococcus* genus, such as *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, are generally considered opportunistic pathogens that can cause brain infections in humans. This disease, known as cryptococcosis, is primarily acquired through inhaling dried yeast or spores found in the environment or bird excreta, with the respiratory tract being the first site of infection. Due to the high mortality rate associated with this disease, particularly during the HIV/AIDS epidemic, numerous studies have been performed to understand the mechanisms of pathogenicity in these microorganisms and identify new therapeutic targets. The study of genes and virulence factors is generally done by constructing null mutants and introducing the wild-type gene back into them (gene complementation). To successfully perform complementation, efficient gene editing methods are crucial to avoid ectopic integration, which can hinder analysis of the gene's role in the disease phenotype. Therefore, using a system that creates a targeted double-strand break in the DNA increases the chances of correctly integrating the exogenous gene into the target organism's genome. The CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) system is a popular tool for generating genetic mutations. To utilize this system, we constructed its key components: an expression cassette for a selection marker as donor DNA, a transient expression cassette for the guide RNA (gRNA), and an expression cassette for the Cas9 endonuclease enzyme. We then transformed *C. gattii* cells using the biolistics protocol, although we did not obtain transformed colonies. Nevertheless, this process allowed us to efficiently reproduce the construction of the essential components for future CRISPR experiments.

Keywords: *Cryptococcus*; null mutants; gene complementation; CRISPR.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO COMPREENSIVA.....	9
1.1. O complexo de espécies <i>Cryptococcus</i> e a criptococose.....	9
1.2. Mecanismos de patogenicidade.....	11
1.2.1. Determinantes de virulência.....	12
1.3. Caracterização funcional de genes e descoberta de novos determinantes de virulência.....	13
1.4. Edição gênica de precisão empregando CRISPR.....	16
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivos específicos.....	18
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	18
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA “GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY”.....	42

1. INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

1.1. O complexo de espécies *Cryptococcus* e a criptococose

A criptococose é uma micose sistêmica causada por fungos do gênero *Cryptococcus*, como *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, acometendo principalmente humanos e outros animais, tipicamente por via respiratória, podendo ocasionar quadros mais graves de meningoencefalite. Os agentes etiológicos desta doença pertencem ao filo Basidiomycota e são leveduras encapsuladas ambientais consideradas patógenos oportunistas (SETIANINGRUM; RAUTEMAA-RICHARDSON; DENNING, 2019). A maioria dos casos graves, causados por *C. neoformans*, ocorre em imunocomprometidos, como por exemplo indivíduos portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Já no caso de *C. gattii*, infecções ocorrem majoritariamente em indivíduos imunocompetentes (Xu *et al.*, 2021).

Mundialmente, a meningite criptocócica é uma doença devastadora, com cerca de 223.100 casos estimados a cada ano. A África Subsaariana é a região mais afetada, respondendo por grande parte das 181.100 mortes anuais relacionadas à doença, o que representa uma taxa de mortalidade alarmante de 80%. Para pessoas vivendo com HIV/AIDS, a meningite fúngica é um perigo ainda maior, sendo responsável por aproximadamente 15% de todas as mortes relacionadas ao vírus. Dados alarmantes revelam que o fungo *C. neoformans* está presente em 50% dos pacientes com HIV/AIDS que falecem com micose sistêmica. Essa estatística reforça a necessidade de medidas urgentes para prevenir e tratar a meningite criptocócica, especialmente em populações mais vulneráveis (Rajasingham *et al.*, 2017). No Brasil, a doença é mais prevalente nas regiões Sul e Sudeste, coincidindo com a distribuição do HIV no país (Firacative *et al.*, 2018).

C. neoformans e *C. gattii* estão amplamente difundidos no ambiente, podendo ser isolados de excretas de aves, do solo e de vegetações. Portanto, o contato com estes fungos por inalação de esporos é comumente assintomático embora possa evoluir para um quadro de doença pulmonar grave e criptococose sistêmica mais comumente em indivíduos imunocomprometidos - Figura 1 (Castro e Silva *et al.*, 2016).

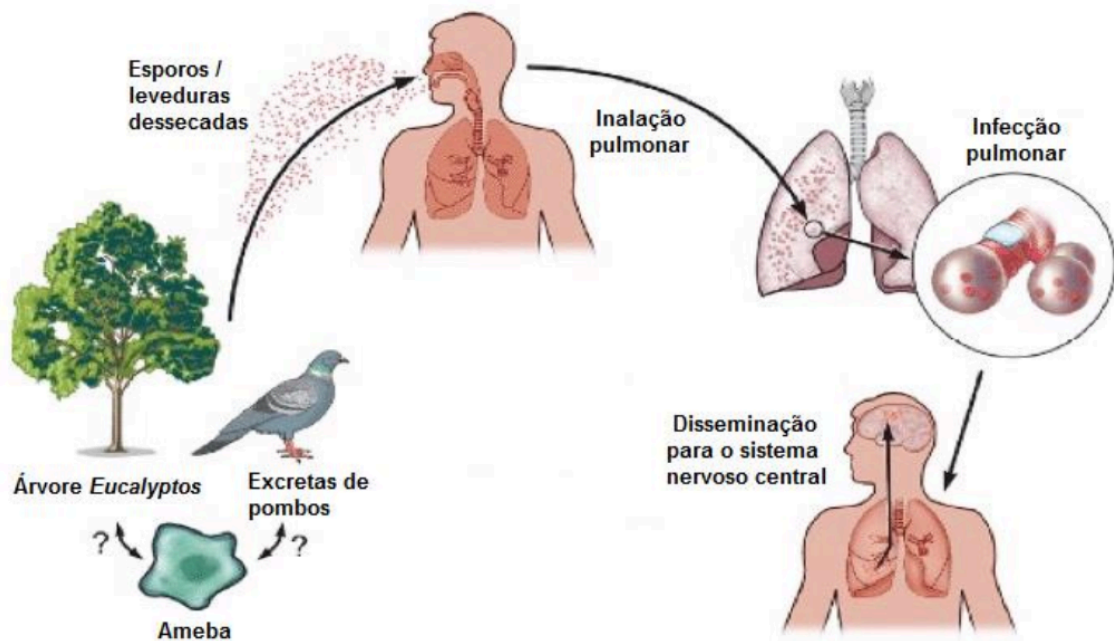


Figura 1. Via de infecção de *Cryptococcus* spp. O fungo sobrevive no ambiente associado a excretas de pássaros, árvores ou amebas ambientais. A inalação de esporos ou leveduras dessecadas pode levar ao quadro de pneumonia, forma pulmonar da doença. Posteriormente, o patógeno pode se disseminar por via hematogênica para o sistema nervoso central, onde pode causar a meningite criptocócica, forma mais grave e letal da doença. Adaptado de (Hull; Heitman, 2002).

O contato com os esporos ou leveduras dessecadas por via respiratória gera uma resposta imune do organismo nos pulmões. Macrófagos e linfócitos T CD4 são recrutados e agem como defesa primária no estágio inicial da doença (Shao *et al.*, 2005). Em hospedeiros saudáveis, a resposta imune é efetiva e capaz de eliminar a maior parte dos esporos inalados. Entretanto, no caso de indivíduos imunocomprometidos, as células proliferam, circulando na corrente sanguínea podendo atingir o sistema nervoso central (SNC) atravessando a barreira hemato-encefálica e gerando o quadro mais grave da doença (Howard-Jones *et al.*, 2022). A capacidade de infectar uma quantidade variada de organismos como amebas, nematódeos, mamíferos e até mesmo plantas, pode ter sido crucial no desenvolvimento de estratégias de evasão do sistema imune, produção de fatores de virulência e, principalmente, a capacidade sobrevivência destes fungos frente às diferentes condições de ambiente do organismo dos hospedeiros. Uma das características já descritas que mais se assemelham ao comportamento do fungo na

interação com as células fagocíticas humanas é a habilidade de sobrevivência a predadores ambientais, representados pelas amebas de vida livre (Casadevall, 2012). A entrada de patógenos no SNC, que origina o quadro mais grave da doença, ocorre majoritariamente pelo endotélio microvascular cerebral. Foram descritas três formas pelas quais esse fenômeno ocorre: (I) migração transcelular, atravessando por meio das células endoteliais que compõem a barreira hematoencefálica; (II) migração paracelular, passando pela junção oclusiva entre as células endoteliais; (III) por um mecanismo conhecido como “Cavalo de Tróia”, em que o patógeno é carregado no interior de células fagocíticas (Chen *et al.*, 2022).

1.2. Mecanismos de patogenicidade

As leveduras *C. neoformans* e *C. gattii* empregam pelo menos três grandes estratégias para estabelecer a infecção no hospedeiro: (i) adaptação ao ambiente do hospedeiro, (ii) mecanismos de evasão ao sistema imune e (iii) produção de determinantes de virulência. A adaptação ao ambiente do hospedeiro envolve capacidade de resistir a temperatura fisiológica do hospedeiro, diferentes fontes de nutrientes, pH e estresse oxidativo. Os mecanismos de evasão ao sistema imune envolvem capacidade de sobrevivência e replicação mesmo após fagocitado podendo ser caracterizado como um patógeno intracelular facultativo, além de alterações fenotípicas da cápsula e do tamanho da célula. Por fim, a produção de fatores de virulência envolvem síntese e secreção de substâncias capazes de gerar dano ao hospedeiro (enzimas degradantes como lipases e proteases) e também acúmulo de melanina (Zaragoza, 2019). Sendo assim, ainda tratando da virulência de *C. neoformans* e *C. gattii*, existem estudos que relatam papel importante da secreção de vesículas extracelulares (VEs) pelos fungos com a finalidade de exportar fatores de virulência e que suas características estruturais poderiam influenciar na interação com as células fagocitárias do sistema de defesa hospedeiro (Castelli *et al.*, 2022). A composição molecular das vesículas e a quantidade secretada das mesmas pode afetar diretamente a interação da célula fúngica com os macrófagos devido a mudança na resposta dessas células fagocíticas (Oliveira *et al.*, 2010).

1.2.1. Determinantes de virulência

Embora existam diferenças marcantes entre as duas espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*, ambas possuem o mesmo conjunto de determinantes de virulência centrais. Por exemplo, a capacidade das leveduras de crescerem a temperaturas elevadas, como as dos hospedeiros mamíferos (Chen; Meyer; Sorrell, 2014), considerado o maior fator diferencial entre as espécies patogênicas e as não patogênicas do mesmo gênero (Petter *et al.*, 2001). Adicionalmente, a atividade da enzima lacase, oxidases dependentes de cobre presentes em diversas plantas, fungos e bactérias, está relacionada com a produção de melanina (Chen; Meyer; Sorrell, 2014). A melanina é um pigmento capaz de estabilizar radicais livres, atuando como um antioxidante contra moléculas geradas pelas células do hospedeiro mamífero (Wang; Casadevall, 1994).

Uma diversidade de enzimas é secretada pelo fungo, como a urease e a fosfolipase B. A urease catalisa a hidrólise de uréia a amônia, e em *Cryptococcus* parece estar envolvida com a transmigração e invasão do SNC (Feder *et al.*, 2015; Olszewski *et al.*, 2004). Já as fosfolipases atuam na hidrólise de ligações de fosfolipídios, como os presentes nas membranas das células do hospedeiro (Chrisman *et al.*, 2011; Cox *et al.*, 2001).

Por fim, a cápsula é a estrutura que foi caracterizada com mais detalhes em *C. neoformans*. É composta principalmente por dois tipos de polissacarídeos: glucuronoxilomanana (GXM) e glucuronoxilomanogalactana (GXMGal). Existem outros componentes menores, que são manoproteínas e estruturas semelhantes à quitina, mas sua função e papel na estrutura da cápsula ainda são desconhecidos. A estrutura da cápsula é complexa e, curiosamente, varia de acordo com as condições ambientais. É organizado em fibras ramificadas que se fixam à parede celular e se ligam entre si por meio de ligações não covalentes (Zaragoza, 2019). Os polissacarídeos capsulares são secretados e têm múltiplos efeitos na resposta imune do hospedeiro. GXM pode inibir a migração de neutrófilos de diferentes maneiras: (I) pela atuação na saída de leucócitos dos vasos sanguíneos porque exhibe propriedades quimio atrativas e diminui a expressão de receptores de quimiocinas; (II) pela inibição da ligação dos leucócitos ao endotélio, induzindo a eliminação de L-selectina e E-caderina dos neutrófilos e também pela ligação ao CD18 (Zaragoza, 2019).

1.3. Caracterização funcional de genes e descoberta de novos determinantes de virulência

Com o sequenciamento completo do genoma de diferentes espécies de *Cryptococcus* (D'Souza *et al.*, 2011; Gröhs Ferrareze *et al.*, 2021; Loftus *et al.*, 2005; Yadav *et al.*, 2018, 2020), é evidente que esforços para determinação de outros determinantes de virulência sejam realizados. Considerando a similaridade da estrutura celular do fungo com as células humanas, se faz necessária a compreensão do papel de genes nos mecanismos que envolvem a patogenicidade desses microrganismos com a finalidade de buscar novos alvos terapêuticos para essa enfermidade (Jung *et al.*, 2018). O desenvolvimento de estratégias de transformação genética de *Cryptococcus* (Wang, 2021) e a possibilidade da geração de mutantes nulos (Jung *et al.*, 2018) têm possibilitado realizar estes estudos pontualmente (gene por gene) ou em grande escala, como por exemplo para a análise funcional de todos os genes codificantes de fosfatases (Jin *et al.*, 2020), ou quinases e fatores de transcrição (Lee *et al.*, 2020).

De acordo com os postulados moleculares de Koch, a construção de mutantes nulos e de mutantes nulos complementados com o gene selvagem possibilita observar correlações entre genes e determinados fenótipos. Os postulados de Koch surgiram durante o século 19 como resultado de uma busca pela compreensão da etiologia de doenças infecciosas, estes postulados inicialmente previam uma relação causal entre doenças e microrganismos (KOCH, 1882 apud (Arras *et al.*, 2015). Quase um século mais tarde com o avanço dos estudos de genética molecular, surgiu a necessidade de redefinir esses postulados, aplicando as novas descobertas nos estudos que buscavam compreender a patogenicidade desses microrganismos. Stanley Falkow foi o pesquisador responsável por estender os postulados para uma visão mais molecular, levando em consideração o papel dos genes na patogenicidade dos microrganismos causadores de doenças. Falkow sugeriu então que o gene de interesse, que se suspeita estar relacionado com alguma atividade que caracterize a virulência de determinado microrganismo, pudesse ser clonado com a finalidade de possibilitar sua análise estrutural e funcional e ainda, além da clonagem, seria necessário, para a confirmação dessas análises, fazer a inativação e em seguida complementação

deste gene, para que se pudesse observar a perda de função e após, possivelmente, restauração dessa função e da patogenicidade, assim respectivamente (Falkow, 1988). Embora a eficiência do uso de técnicas de genética molecular para o estudo e caracterização de genes seja amplamente reconhecida, essas técnicas apresentam algumas limitações, como no processo de inserção de um cassete, tanto para inativação quanto para complementação gênica, que ocorrem essencialmente por meio de dois mecanismos: recombinação homóloga ou junções de terminações não homólogas (NHEJ, do inglês non-homologous end joining). Esses mecanismos apresentam baixas taxas de eficiência, podendo levar a integração do cassete em sítios ectópicos (dependendo do organismo), e não no sítio alvo de interesse, afetando a análise eficiente da função do gene em estudo (Arras *et al.*, 2016).

A mutagênese sítio dirigida é uma ferramenta essencial para a caracterização funcional de genes e, portanto, também é usada para identificar genes de virulência em patógenos, envolvendo interromper ou alterar um gene de interesse explorando a recombinação homóloga (HR), a maquinaria de reparo de quebra de fita dupla (DSB) das células, onde as extremidades separadas são unidas por recombinação com uma fita homóloga. Para a disrupção do gene, um oligonucleotídeo sintético, muitas vezes referido como DNA doador, é introduzido numa célula que é então incorporado no gene através da HR. Dependendo do DNA doador utilizado, a disrupção pode ser obtida através de uma mutação do tipo *frameshift* onde um peptídeo inativo ou alterado é produzido, ou uma deleção pode ser obtida com a inserção de um longo trecho de bases, como um gene repórter ou marca de resistência, resultando na produção de nenhuma proteína. Pode-se então determinar a mudança no fenótipo e, finalmente, deduzir a função do produto do gene (du Plooy *et al.*, 2018).

Em *Cryptococcus sp.*, geralmente a obtenção de mutantes nulos se dá pela introdução, por transformação mediada por biobalística, de cassetes de ruptura genética linear com regiões flanqueadoras > 300 pb de cada lado do gene alvo. Os resultados de recombinação homóloga variam de 3 a 10 %, dependendo do sítio alvo (du Plooy *et al.*, 2018). A eficácia de inativação gênica foi bastante melhorada com o desenvolvimento de estratégias como *split marker/double-joint PCR (DJ-PCR)* para geração de mutantes nulos (Fig. 2) (Jung *et al.*, 2018).

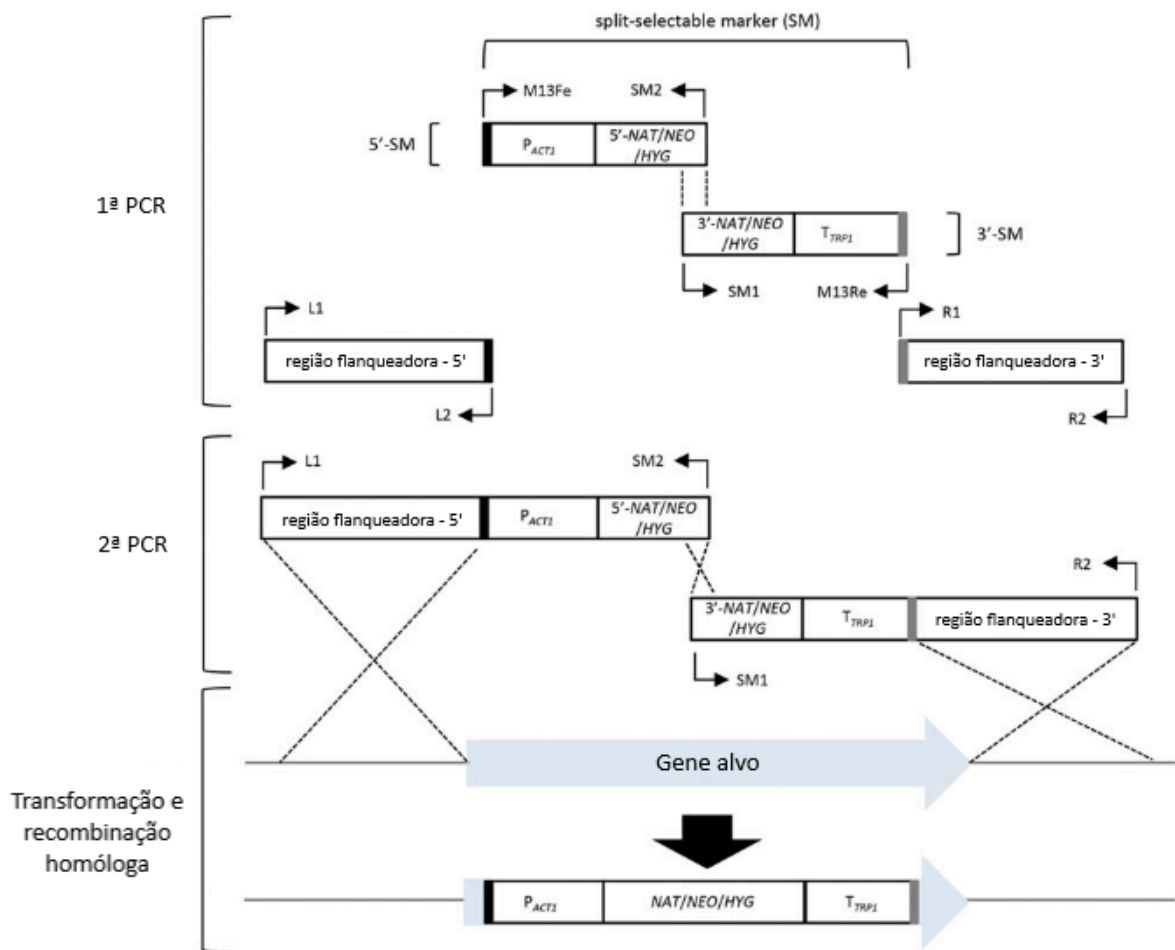


Figura 2. Estratégia para deleção de genes usando *split marker/double-joint PCR*. Na primeira rodada de PCR, as regiões flanqueadoras 5' e 3' do gene alvo e os fragmentos da marca de seleção são amplificados com os pares de *primers* indicados. Na segunda rodada de PCR, ocorre a fusão dos fragmentos 5' com porção da marca da seleção, bem como a fusão dos fragmentos 3' com a outra porção da marca de seleção. Os dois produtos de PCR são então combinados e introduzidos nas células utilizando transformação biolística, onde espera-se que ocorra recombinação homóloga na marca e no gene alvo, inativando o gene. (Jung *et al.*, 2018).

Existem atualmente duas abordagens amplamente utilizadas para complementar uma deleção genética em *Cryptococcus sp.* O método mais comum é integrar aleatoriamente uma cópia do gene do tipo selvagem no genoma. No entanto, os genes codificadores de proteínas representam 85% do genoma de *Cryptococcus sp.*, e quando se leva em consideração o grande número de miscRNAs, RNAs aleatórios envolvidos em uma variedade de funções, também

transcritos, é altamente provável que esta integração aleatória interrompa outros genes e produza fenótipos confusos. É possível resolver este problema através da criação de múltiplas cepas independentes e complementadas para encontrar um fenótipo comum. Eticamente, apenas uma destas estirpes pode ser utilizada num modelo de virulência murina, tornando impossível determinar se a virulência foi afetada pela interrupção de outro gene não-alvo associado à virulência até após a infecção dos animais. Uma abordagem alternativa de complementação é reintroduzir o gene do tipo selvagem de volta ao seu local nativo. No entanto, isso pode influenciar a expressão de genes adjacentes devido às pequenas regiões intergênicas e transcrições frequentemente sobrepostas do genoma de *Cryptococcus sp* (Arras *et al.*, 2015). Assim, diversas estratégias têm sido empregadas para encontrar *safe haven* genômicos, que se entende por pequenas regiões livres de genes, em que mutações nessas regiões não impactam o *fitness* da célula de modo geral, para introdução de cassetes de complementação sem que ocorram efeitos deletérios em decorrência da integração (Arras *et al.*, 2015; Fan; Lin, 2020; Li *et al.*, 2022).

1.4. Edição gênica de precisão empregando CRISPR

O sistema CRISPR foi descoberto como mecanismo de defesa imune adaptativa de procariotos, e é aclamado pela sua eficiência na edição gênica especialmente em organismos que são refratários à manipulação gênica. O sistema CRISPR pode ser construído com base em dois componentes essenciais: um RNA guia (gRNA), que contém uma região que será reconhecida pela enzima endonuclease e outra região de entorno de 20 pares de base que anela com a região alvo do gene em que se quer realizar a quebra dupla do DNA, e um complexo proteico representado geralmente pela endonuclease Cas9. Esse sistema é integrado nas células geralmente em cassetes de expressão transitória (Wang *et al.*, 2016). A eficiência do sistema se dá pela possibilidade de gerar uma quebra dupla guiada no DNA reduzindo a chance de integração aleatória do cassete de interesse a ser inserido.

Em 2016, dois grupos de pesquisa separados aplicaram CRISPR-Cas9 às pesquisas de *C. neoformans* pela primeira vez. Wang *et al.* (2016) construíram dois cassetes contendo o gDNA (DNA guia, a ser transcrito em gRNA) e o gene

codificante da enzima nuclease Cas9, respectivamente, e fizeram uso de eletroporação para transformar os cassetes em *C. deneoformans* (Wang *et al.*, 2016). Um gene codificante da nuclease Cas9, fusionado a dois sinais de localização nuclear, foi empregado e colocado sob o controle de um promotor ACT1 e seguido por um terminador bGHpA. O gDNA foi colocado sob o controle de um promotor do gene U6 nativo e um terminador 6-T para produção de gRNA. Os cassetes foram co-transformados nesta levedura e o gRNA foi projetado para inativar o gene *ADE2*, criando um auxotrófico de adenina que gera colônias rosadas em meio com baixo nível de adenina. Cerca de 82-88% dos transformantes eram auxotróficos. Este grupo também mostrou a possibilidade de inativação por HR, inserindo um marcador de resistência à higromicina B. Neste caso, o gene CAS9 e o gDNA estavam ambos no mesmo vetor, permitindo a cotransformação com o DNA do doador. Por sua vez, Arras *et al.* (2016) descobriram que a expressão de CAS9 em *C. neoformans* não tem efeito sobre o crescimento, produção de determinantes de virulência ou capacidade de causar doença em um modelo murino (Arras *et al.*, 2016). O sistema de duas etapas desenvolvido por este grupo envolveu primeiro a construção de uma cepa que expressa o gene CAS9 após integração em uma região do genoma livre de genes. Esta é uma abordagem útil que diminui a carga de trabalho para atingir uma série de genes, exigindo apenas a adição de gDNA em estudos subsequentes. Arras *et al.* (2016) conseguiram esta integração do Cas9 com a transformação biolística, o que produz taxas de recombinação homóloga mais elevadas. Em vez de usar um promotor de RNA polimerase III para a transcrição do gDNA, os autores adicionaram dois fragmentos de ribozimas às extremidades do gDNA. Após a transcrição, o fragmento sofre autoclivagem liberando uma molécula de gRNA inalterada. A vantagem desta abordagem é que qualquer promotor pode ser utilizado para a transcrição do gDNA. Semelhante a Wang *et al.* (2016), Arras *et al.* (2016) também visou o gene *ADE2* como prova de conceito, adicionando um sistema bem-sucedido de duas etapas ao sistema de uma etapa de Wang *et al.* (2016).

Estudos subsequentes delimitaram a utilização de CRISPR em sistemas transitórios. A estratégia TRACE (*Transient CRISPR-Cas9 Coupled with Electroporation*) consiste em três componentes independentes que podem ser gerados por PCR: o cassete de expressão da Cas9, o cassete de expressão sgRNA e o DNA doador (Cassete de deleção gênica). Esta estratégia foi eficaz na geração

de mutantes de gene único, usando o locus *ADE2* como exemplo, bem como pode deletar efetivamente vários genes em uma única transformação (Fan; Lin, 2018).

2. JUSTIFICATIVA

Levando em consideração a necessidade do desenvolvimento de ferramentas adequadas para a complementação de mutantes nulos em linhagens do gênero *Cryptococcus*, hipotetizamos que o uso do sistema de edição gênica de precisão baseado em CRISPR pode ser considerado como alternativa para que não sejam observados efeitos oriundos de inserções não adequadas do cassete de complementação, possibilitando o entendimento da função dos genes nas características fenotípicas dos organismos.

3. OBJETIVOS

Desenvolvimento de um processo para construção de mutantes nulos complementados em espécies do gênero *Cryptococcus* empregando o sistema CRISPR/Cas9.

3.1. Objetivos específicos

- Construção de cassetes para complementação do mutante nulo do gene *NOP16* em *C. gattii*;
- Construção de cassetes para expressão de um gRNA que reconheça a marca de resistência (Hyg) presente no mutante nulo *nop16*;
- Construção de mutantes nulos complementados do gene *NOP16* empregando CRISPR/Cas9;

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Este manuscrito foi redigido de acordo com as normas da revista *Genetics and Molecular Biology* (ISSN online version: 1678-4685). As normas para redação dos manuscritos se encontram no Anexo A.

CRISPR COMO FERRAMENTA PARA EDIÇÃO GÊNICA EM *Cryptococcus gattii*

Carolina Farias Stadkowiski¹, Igor Daniel Ribeiro² e Charley Christian Staats^{1,2*}

1 Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

2 Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

* Autor de correspondência. Endereço: Avenida Bento Gonçalves 9500, Prédio 43421, Centro de Biotecnologia, Bloco 4, Campus do Vale, UFRGS. Caixa Postal 15005. Porto Alegre, RS, Brasil, 91501-970. Phone 55 51 3308 6080; Fax 55 51 3308 7309. Email: staats@ufrgs.br. ORCID: 0000-0002-2433-6903

Título curto: CRISPR e *Cryptococcus*

Keywords: *Cryptococcus*; mutantes nulos; complementação gênica; CRISPR.

RESUMO

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são os principais agentes causadores da criptococose em humanos. Adquirida através da inalação de esporos, afeta principalmente o trato respiratório podendo evoluir para uma meningite, caracterizando a forma mais grave da doença. Dados os índices significativos de mortalidade associados à doença, especialmente durante a epidemia de HIV/AIDS, inúmeros estudos têm buscado compreender os mecanismos de patogenicidade desses microrganismos e identificar novos alvos terapêuticos. A edição gênica, importante para caracterizar genes de virulência, é desafiadora. O sistema CRISPR/Cas9, inspirado em procariotos, permite edição eficiente. Neste estudo, realizamos a construção dos componentes necessários para a aplicação da técnica CRISPR para a transformação de *C. gattii*, sendo eles: cassetes de expressão para marca de seleção, gRNA e enzima Cas9. Embora não tenhamos obtido transformantes, estabelecemos uma metodologia para aplicação futura do CRISPR nesse fungo.

1. Introdução

A criptococose é uma micose sistêmica que acomete humanos e animais, causada predominantemente por duas espécies de fungos ambientais do gênero *Cryptococcus*: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Zaragoza, 2019). A forma mais grave da doença pode ser definida por um quadro pulmonar grave que pode disseminar até o sistema nervoso central evoluindo para uma meningoencefalite que, se não rapidamente diagnosticada e tratada, pode ser letal (Jung *et al.*, 2018). *C. neoformans* e *C. gattii*, que podem ser isolados de excretas de aves, do solo ou de vegetações. Os casos mais graves ocorrem mais comumente em indivíduos imunocomprometidos, como portadores do vírus HIV ou receptores de terapia imunossupressora (Warnock, 1999).

Devido a semelhança das estruturas celulares do fungo com as estruturas das células humanas, as opções de tratamento para esta enfermidade ainda são limitadas, fazendo com que exista a necessidade de busca por novos alvos terapêuticos. Os avanços nos estudos dos genes permitem a compreensão dos mecanismos de patogenicidade dos microrganismos assim como também permite que sejam encontradas novas alternativas de tratamento para doenças causadas por microrganismos, entre outras possibilidades. Sendo assim a utilização de ferramentas eficientes de manipulação genética de microrganismos se faz necessária, com o intuito de gerar mutantes nulos e avaliar o efeito da ausência de determinado gene e/ou proteína na infectividade da linhagem, bem como sensibilidade a agentes terapêuticos (Arras *et al.*, 2016).

Como já relatado, as taxas de integração de genes em *Cryptococcus* por recombinação homóloga é muito baixa (Goins; Gerik; Lodge, 2006) devido ao processo de junção por extremidades não-homólogas (JENH), do inglês *non-homologous end joining* (NHEJ), que gera integração ectópica podendo afetar outras regiões do genoma do fungo sendo um entrave para a análise da função dos genes (Arras *et al.*, 2016). Como uma alternativa para este problema existe a possibilidade de gerar uma quebra dupla direcionada no DNA utilizando o sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*), sistema este derivado do sistema imune adaptativo de procariotos que permite gerar quebras

duplas no DNA em sítios específicos, pela associação de um RNA guia e uma endonuclease, aumentando consideravelmente as chances de correta integração de um cassete no genoma de organismos alvo de estudos, como já descrito em estudos prévios (Sorek; Lawrence; Wiedenheft, 2013).

De acordo com os postulados moleculares de Koch, a disrupção de um gene pode auxiliar no entendimento da função dos genes e sua associação com os mecanismos de patogenicidade dos microrganismos, assim a construção de mutantes gera fenótipos distintos que podem ser observados experimentalmente (Falkow, 1988). Este trabalho objetiva assim construir e testar a funcionalidade do sistema CRISPR em linhagem mutante de *Cryptococcus* que apresenta marca de seleção para higromicina, sendo gerados mutantes resistentes a nourseotricina pela substituição da marca de seleção.

2. Materiais e métodos

2.1. Linhagens e meios de cultivo

Foram utilizadas nos experimentos as linhagens R265 de *C. gattii* (WT) e mutantes nulos para o gene *nop16*, gerados no laboratório e cuja análise ainda não foi concluída. O cultivo das células foi realizado rotineiramente em meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%), com adição de ágar (1,5%) quando meio sólido, e incubadas à temperatura de 30°C. A propagação de plasmídeos foi realizada na linhagem de *Escherichia coli* DH10 β , rotineiramente cultivada em caldo LB, com adição de ágar (1,5%) quando meio sólido, e incubadas à temperatura de 37 °C. Ampicilina foi adicionada na concentração de 50 μ g/mL para seleção de bactérias recombinantes.

2.2. Construção do vetor de complementação pJAF1::NOP16

A amplificação do gene *NOP16* (CNBG_3695) acrescidos de 1000 pb a montante e a jusante foi realizada com *primers* específicos (Tabela 1) e a enzima Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) de acordo com as recomendações do fabricante. O fragmento foi purificado com o sistema PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Thermo) de acordo com as recomendações do fabricante. O plasmídeo pJAF1 (Fraser *et al.*, 2003) - Figura 1 -

foi clivado com a enzima EcoRV (New England Biolabs) de acordo com as recomendações do fabricante. A clonagem do fragmento no plasmídeo pJAF1 foi realizado com o protocolo de clonagem livre de ligase denominado *Hot Fusion* (Fu *et al.*, 2014).

2.3. Amplificação do cassete de expressão de resistência a nourseotricina

A amplificação do cassete de expressão do gene que confere resistência a nourseotricina foi realizada com a enzima Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando os primers M13 forward e M13 reverse (Tabela 1), tendo como molde o plasmídeo pA14 (Idnurm *et al.*, 2004) - Figura 2.

Tabela 1. Sequências de primers utilizados.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
Comp_Nop16F	GCC AGT GTG ATG GAT CTT GCT CAT AAT CCT GTG AAT GA
Comp_Nop16R	GCG AAT TCT GCA GAT AGC CTA CAG ATC TTG CAC T
NOP16RTF	ACC CGC GAC AGA GGA AAC AAG
NOP16RTR	CGC TTC TAT GAG CCC ATC TCC
Hyg_sgRNAF	ACA AAT CGC CCG CAG AAG CGG TTT TAG AGC TAG AAA TAG CAA GTT
Hyg_sgRNAR	CGC TTC TGC GGG CGA TTT GTA ACA GTA TAC CCT GCC GGT G
SK	TCT AGA ACT AGT GGA TC
KS	CGA GGT CGA CGG TAT CG
M13F	GTA AAA CGA CGG CAG
M13R	CAG GAA ACA GCT ATG AC

2.4. Construção do cassete de expressão de gRNA

A predição de um gRNA que permitisse o reconhecimento do gene *hph*, que codifica a marca de seleção para higromicina, presente no mutante *nop16*, foi realizado empregando a ferramenta Benchling. Com base nesta sequência, foram utilizados diferentes *primers*, que reconhecem sequências específicas presentes no plasmídeo pBHM2329 - Figura 3 (Fan; Lin, 2018) - para uma amplificação sequencial de fusão

com o intuito de construir um cassete de expressão do gRNA, conforme previamente descrito (Fan; Lin, 2018; Jung *et al.*, 2018), empregando a enzima Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) de acordo com as recomendações do fabricante.

2.5. Transformação biolística

A transformação de células de *C. gattii* WT ou *nop16* foi realizada essencialmente conforme descrito previamente (Jung *et al.*, 2018), utilizando 2 µg do plasmídeo pJAF1::*NOP16*. Alternativamente, foram utilizados 700 ng do cassete de expressão do gRNA que tem como alvo o gene *hph*, presente no mutante *nop16*, 2 µg do plasmídeo pBHM2403, que contém um cassete para expressão de Cas9 fusionada a sítios de localização nuclear - Figura 4 (Fan; Lin, 2018), e 2 µg do cassete de expressão da marca de resistência a nourseotricina. No caso da transformação com o plasmídeo pJAF1::*NOP16*, a seleção foi realizada em meio YPD contendo 200 µg/mL de G418 (Sigma-Aldrich). No caso da transformação empregando CRISPR, a seleção foi realizada em meio YPD contendo 100 µg/mL de Nourseotricina (Jena Bioscience).

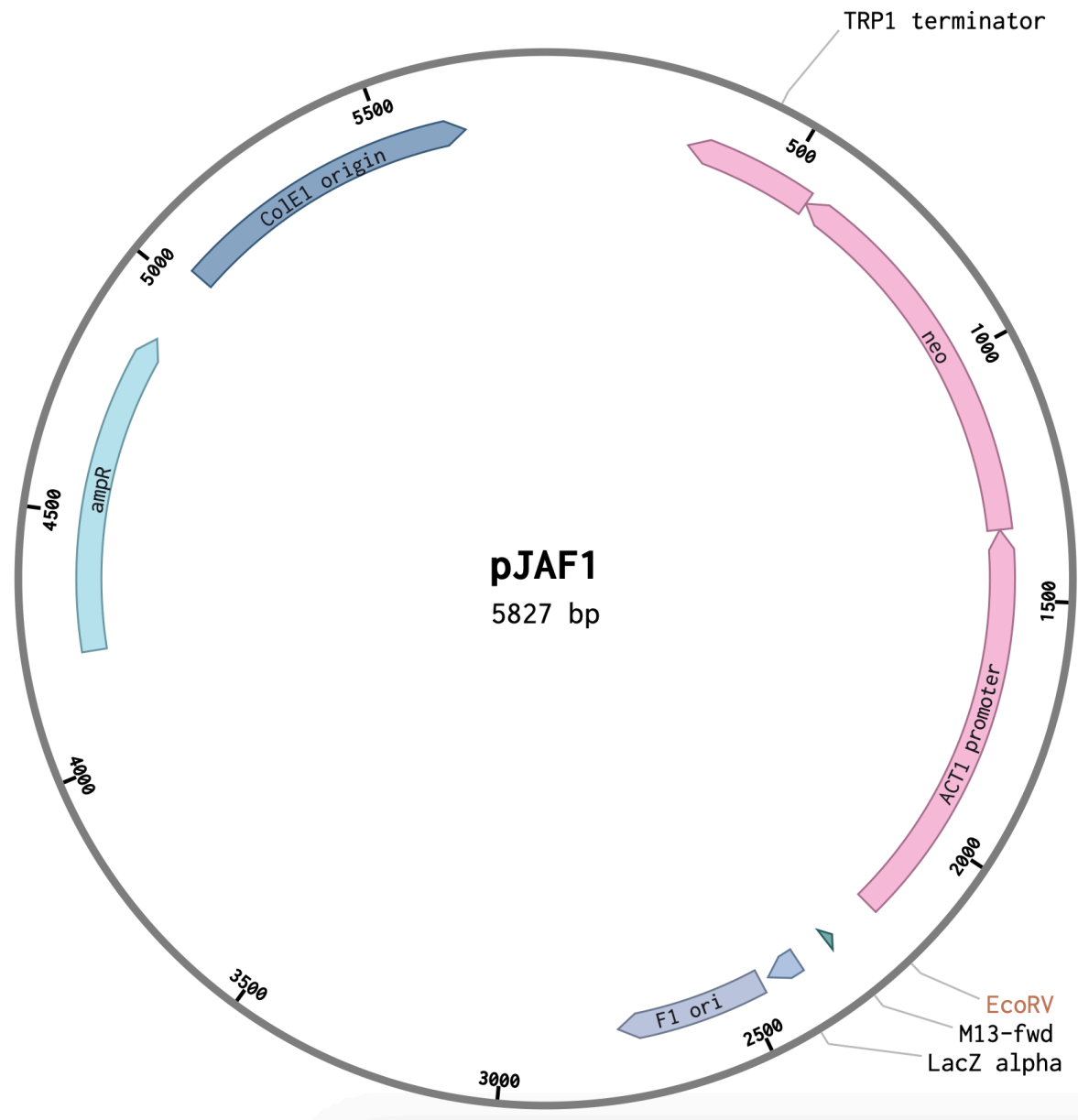


Figura 1. Mapa físico do plasmídeo pJAF1. São ilustrados os elementos referentes ao cassete de expressão do gene *neo* (em rosa), que confere resistência a G418 (em rosa), e o sítios de clivagem da enzima de restrição *EcoRV*. São ilustrados também as origens de replicação (F1 ori e ColE1 ori), bem como a marca de resistência a ampicilina.

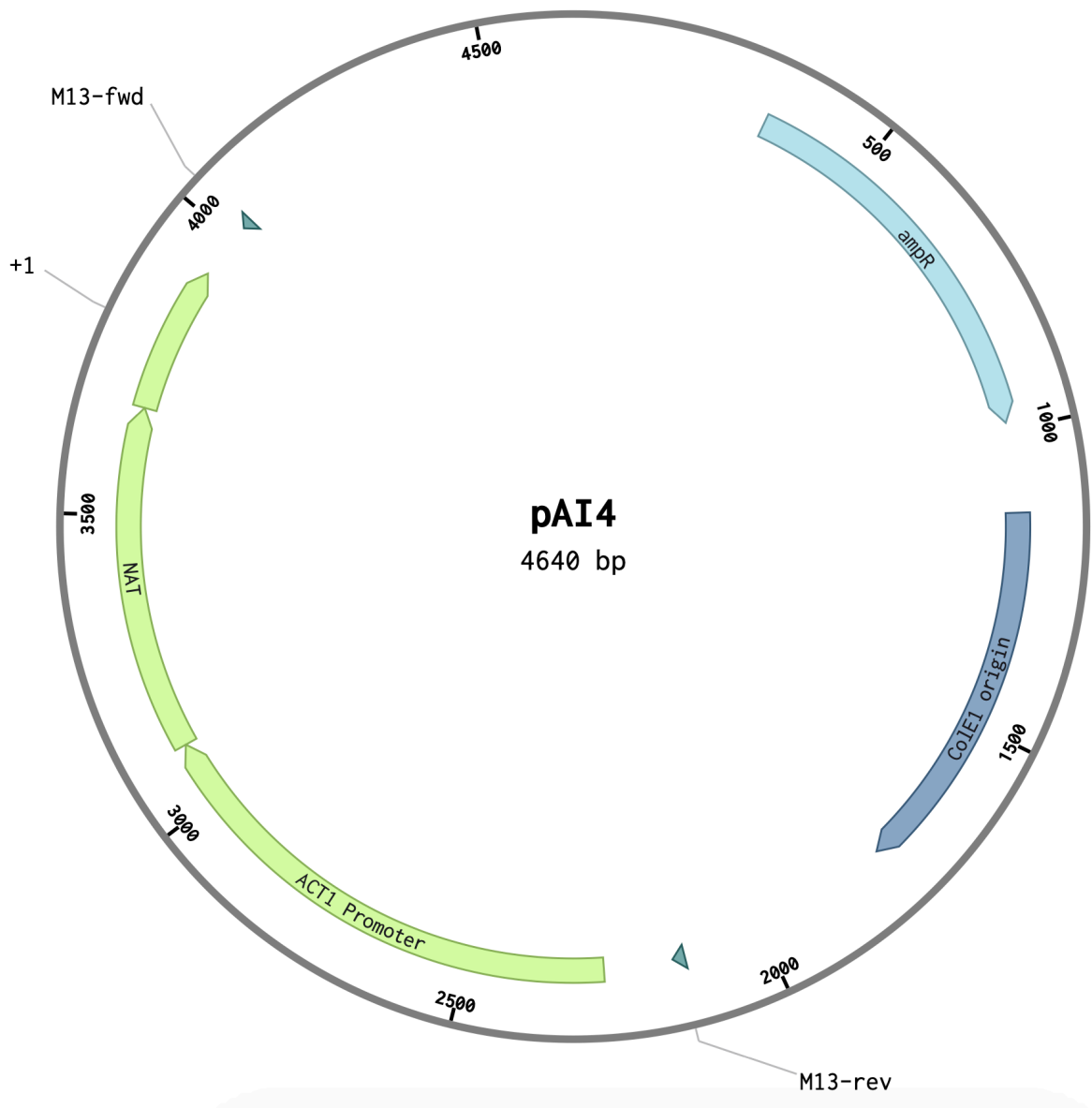


Figura 2. Mapa físico do plasmídeo pAI4. São ilustrados os elementos referentes ao cassete de expressão do gene que confere resistência a nourseotricina (em verde). São ilustrados também a origem de replicação (ColE1 ori), a marca de resistência a ampicilina e a localização dos sítios de hibridização dos *primers* M13 Forward e M13 Reverse.

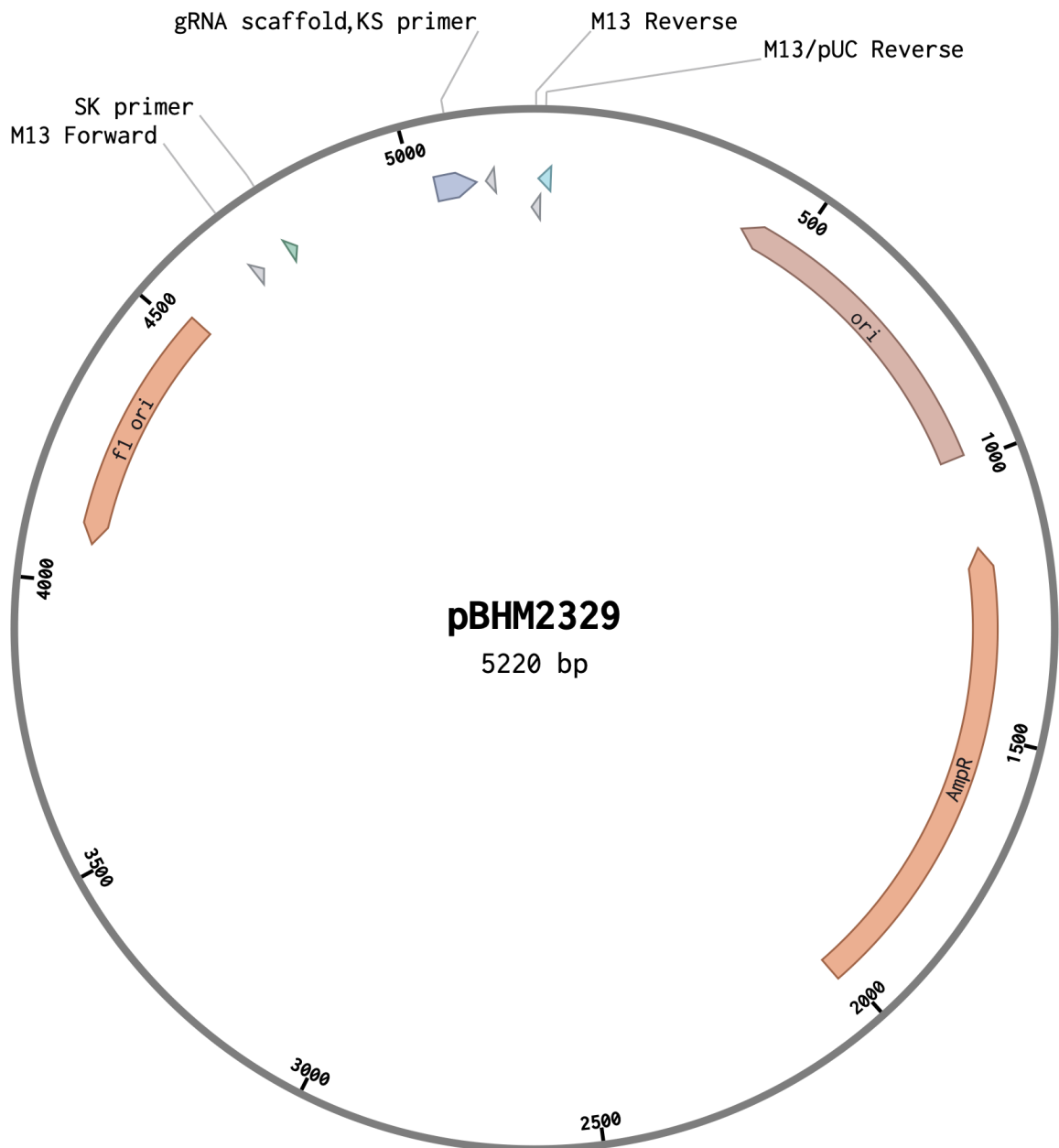


Figura 3. Mapa físico do plasmídeo pBHM2329. São ilustrados os elementos referentes ao cassete de expressão do gRNA (em cinza - gRNA scaffold). São ilustrados também as origens de replicação (F1 ori e ColE1 ori), a marca de resistência a ampicilina e a localização dos sítios de hibridização dos *primers* M13 Forward, M13 Reverse, SK primer e KS primer.

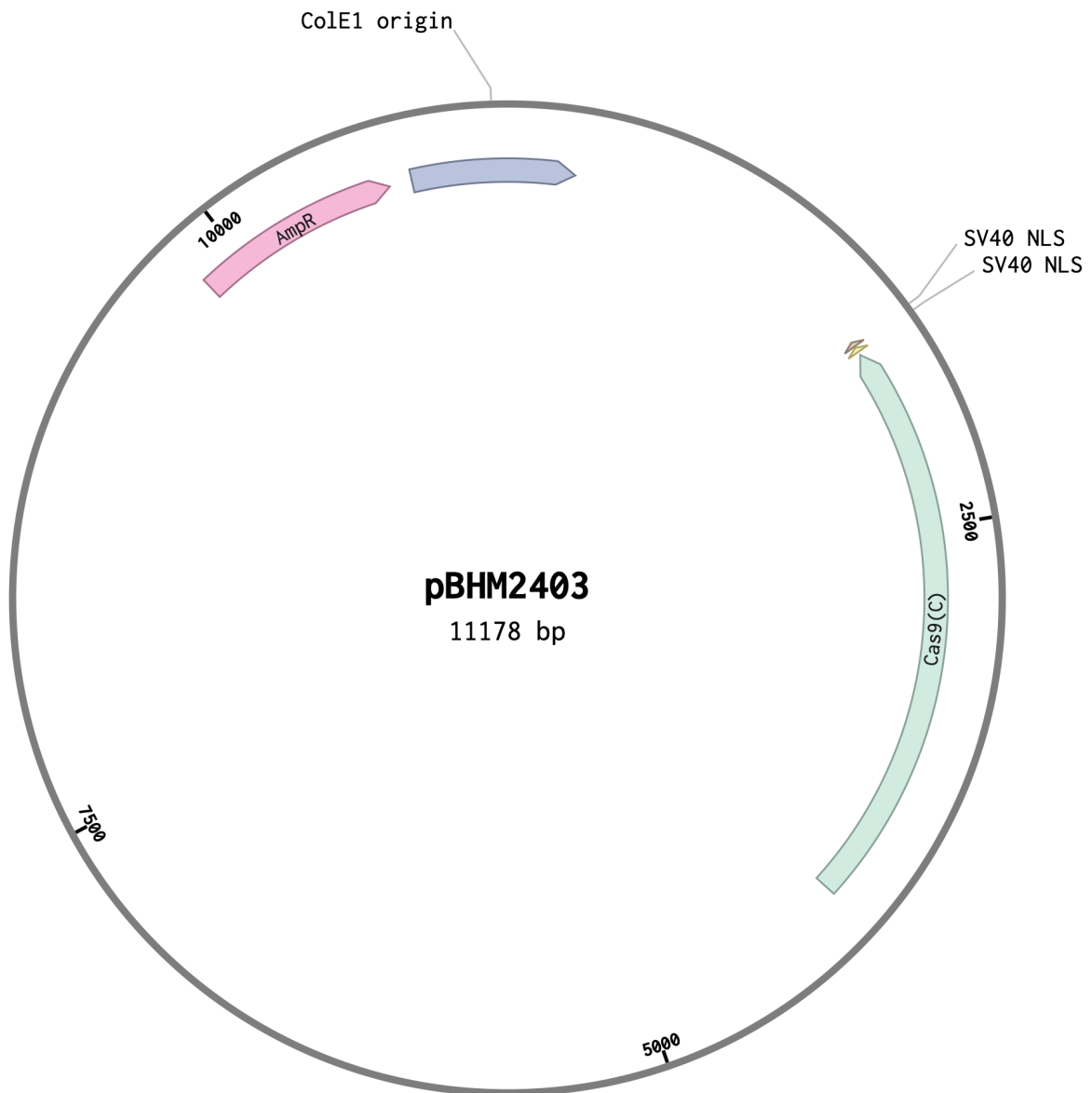


Figura 4. Mapa físico do plasmídeo pBHM2403. São ilustrados os elementos referentes ao cassete de expressão de Cas9 (verde) fusionadas e sequências codificantes de sítios de localização nuclear - SV40 NLS (amarelo e dourado), bem como a origem de replicação (ColE1 ori) e a marca de resistência a ampicilina (*AmpR*).

3. Resultados e discussão

Com a finalidade de gerar cassetes para a complementação do gene *nop16* em uma linhagem de mutantes nulos obtidas em trabalhos anteriores do grupo, foi realizada a construção de um cassete de complementação, utilizando o plasmídeo pJAF1 que contém uma marca de seleção para o antibiótico G418. A região codificante do gene *NOP16*, acrescida de 1000 pb a montante e a jusante, foi obtida

por PCR com os *primers* Comp_Nop16F e Comp_Nop16R, gerando um fragmento de aproximadamente 3.000 pb (Fig. 5). Este fragmento foi purificado e clonado no sítio EcoRV do plasmídeo pJAF1, pela metodologia de *Hot Fusion*, gerando o mapa predito na Figura 6.

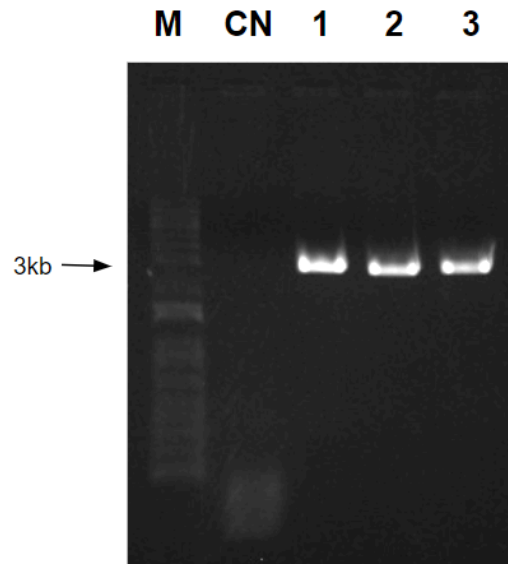


Figura 5. Amplificação de fragmento para complementação de mutantes nulos *nop16*. O fragmento foi amplificado com *primers* específicos, sendo o resultado avaliado por eletroforese em gel de agarose. M, marcador de tamanho molecular 1 kb plus (Thermo Scientific); CN, controle negativo da reação; 1 a 3, amplificações de três amostras distintas de DNA de *C. gattii*. Número à esquerda representa o tamanho do *amplicon* baseado em comparação com o marcador de tamanho molecular foi obtido por PCR a partir do DNA genômico da linhagem R265 de *C. gatti*.

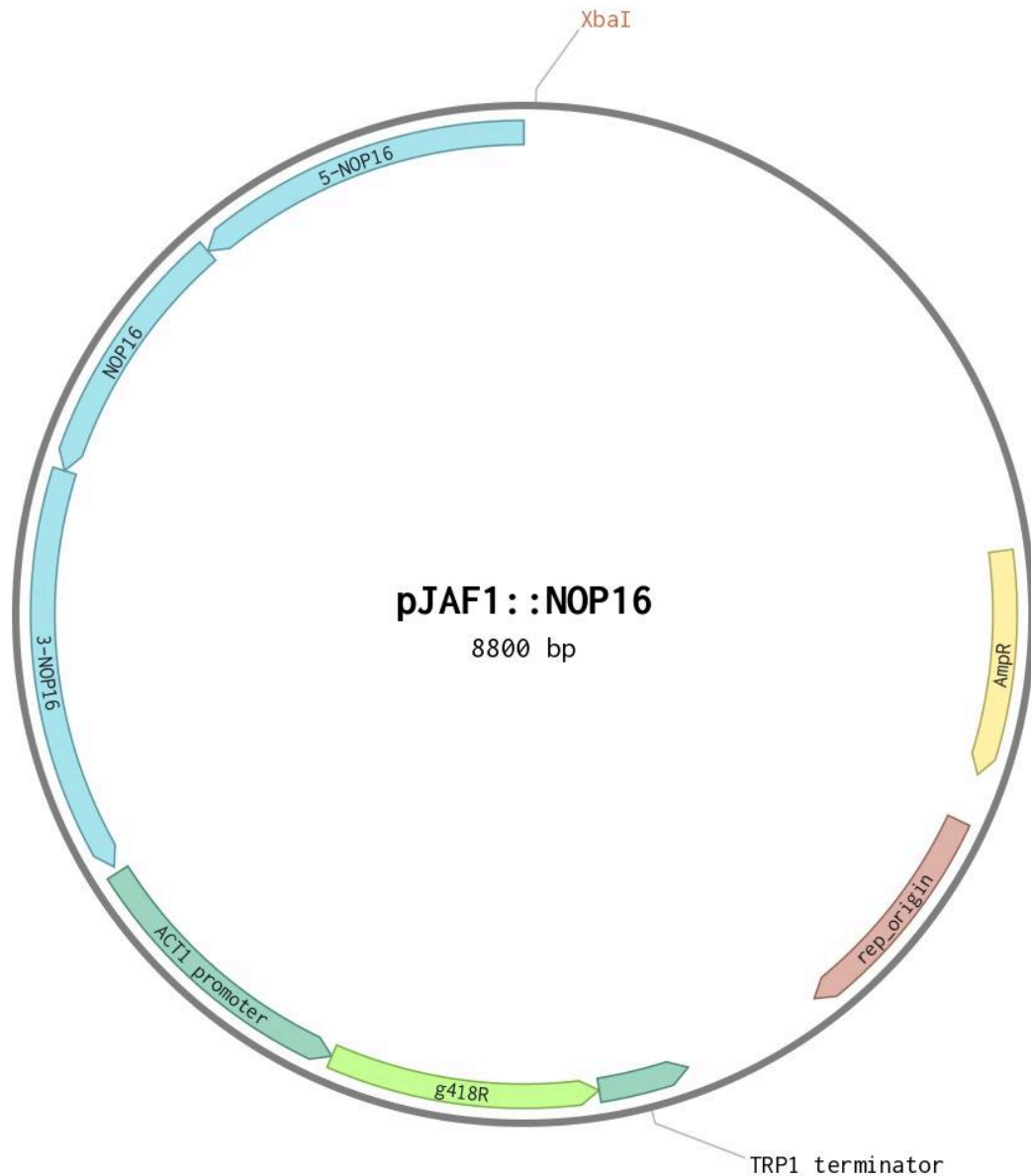


Figura 6. Mapa físico do plasmídeo pJAF1::NOP16. São ilustrados a sequência da região codificante do gene *NOP16* (em azul) bem como as suas regiões *upstream* e *downstream* (5-NOP16 e 3-NOP16, respectivamente), bem como o cassete de resistência a g418 (em verde). *AmpR*, gene de resistência a ampicilina (em amarelo).

O produto da clonagem foi transformado por choque térmico em células competentes de *E. coli*. Oito colônias foram selecionadas para realização de uma PCR de colônia (*primers* Nop16RTF e Nop16RTR) com a finalidade de confirmar a presença da sequência de interesse. As oito colônias foram positivas (Fig. 7) e então realizou-se um protocolo de miniprep para extração plasmidial. Com a obtenção dos plasmídeos, os mesmos foram linearizados com a enzima de restrição XbaI para

que pudessem ser utilizados na transformação como cassetes de complementação (Fig. 8).

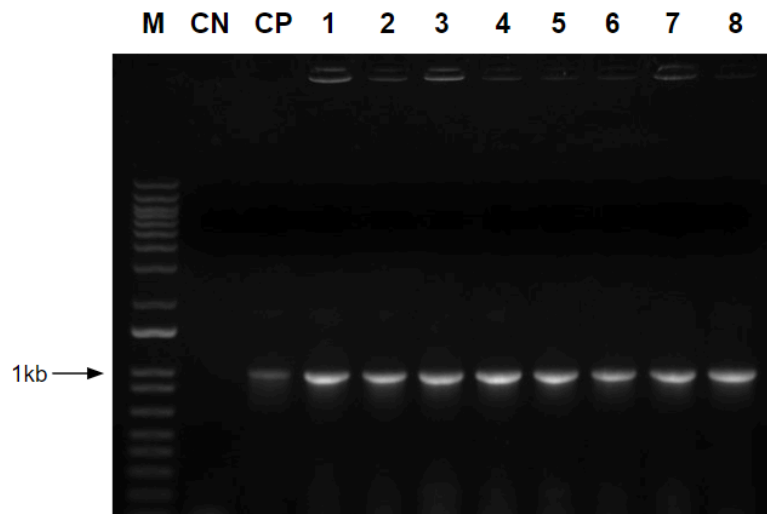


Figura 7. Amplificação de fragmento diagnóstico para detecção de clones recombinantes pJAF1::NOP16. O fragmento foi amplificado com *primers* específicos, sendo o resultado avaliado por eletroforese em gel de agarose. M, marcador de tamanho molecular 1 kb plus (Thermo Scientific); CN, controle negativo da reação; CP, controle positivo, amplificação com DNA genômico de *C. gattii*; 1 a 8, amplificações de 8 amostras distintas de DNA plasmidial de clones de *E. coli*. Número à esquerda representa o tamanho do *amplicon* baseado em comparação com o marcador de tamanho molecular.

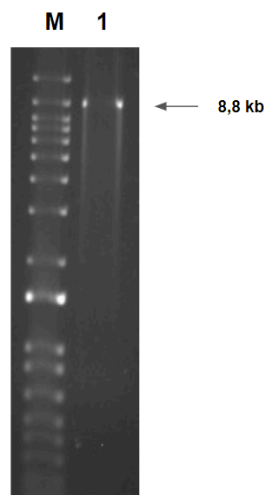


Figura 8. Confirmação da linearização do plasmídeo pJAF1::NOP16 com a enzima de restrição XbaI. O fragmento foi gerado por clivagem com enzima de restrição (XbaI), sendo o resultado avaliado por eletroforese em gel de agarose. M, marcador de tamanho molecular 1 kb plus (Thermo Scientific); 1 Amplificação da amostra de DNA plasmidial linearizado. Número à direita representa o tamanho do *amplicon* baseado em comparação com o marcador de tamanho molecular.

Assim, com a obtenção do cassete de complementação foi realizada a transformação da linhagem nula para *nop16* pela metodologia de biolística. Após 3 dias de incubação das placas a 30°C não foi observado desenvolvimento de colônias em meio seletivo contendo G418. O processo de transformação foi repetido e, mais uma vez, não obtivemos sucesso na construção das linhagens complementadas. Hipotetizamos que a mutação no gene *NOP16* poderia ocasionar algum problema no processo de transformação e assim, avaliamos se o processo de transformação seria bem sucedido quando fosse utilizada a linhagem selvagem (R265). Mais uma vez, não foi possível obter linhagens transformantes, mesmo utilizando como recipiente a linhagem selvagem.

Considerando o insucesso da transformação da linhagem nula e da linhagem selvagem, hipotetizamos que o problema poderia residir no processo de integração do cassete ou no plasmídeo construído. Considerando que o plasmídeo pJAF1::*NOP16*, que tem como base o plasmídeo pJAF1, que já foi utilizado em construções de complementação em trabalhos do próprio grupo (Schneider *et al.*, 2015), hipotetizamos que este plasmídeo propriamente dito pode ter algum problema de integração em células de *C. gattii*. Levando em consideração que o objetivo neste momento seria tentar aumentar a taxa de transformação, a alternativa seria utilizar o sistema CRISPR. Para isso foi realizada a construção de um cassete para expressão transitória do gRNA seguindo um protocolo de PCR de fusão (Figura 9). A primeira etapa consiste em amplificar, a partir do plasmídeo pBHM2329, duas porções do cassete de expressão do gRNA que tinha como alvo o gene *hph* presente no mutante nulo *nop16*: (i) a porção do promotor associado ao gRNA com os *primers* M13 Forward e Hyg_sgRNAR e (ii) a porção do gRNA associado ao terminador com os *primers* M13 Reverse e Hyg_sgRNAF. Foi possível amplificar adequadamente um fragmento de 400 pb aproximadamente em cada uma destas reações (Figura 10). A segunda reação, de fusão, consistia na utilização dos *primers* SK e KS para obtenção do cassete de expressão propriamente dito. Foi possível obter o fragmento esperado de 400 pb referente ao processo de fusão (Figura 10).

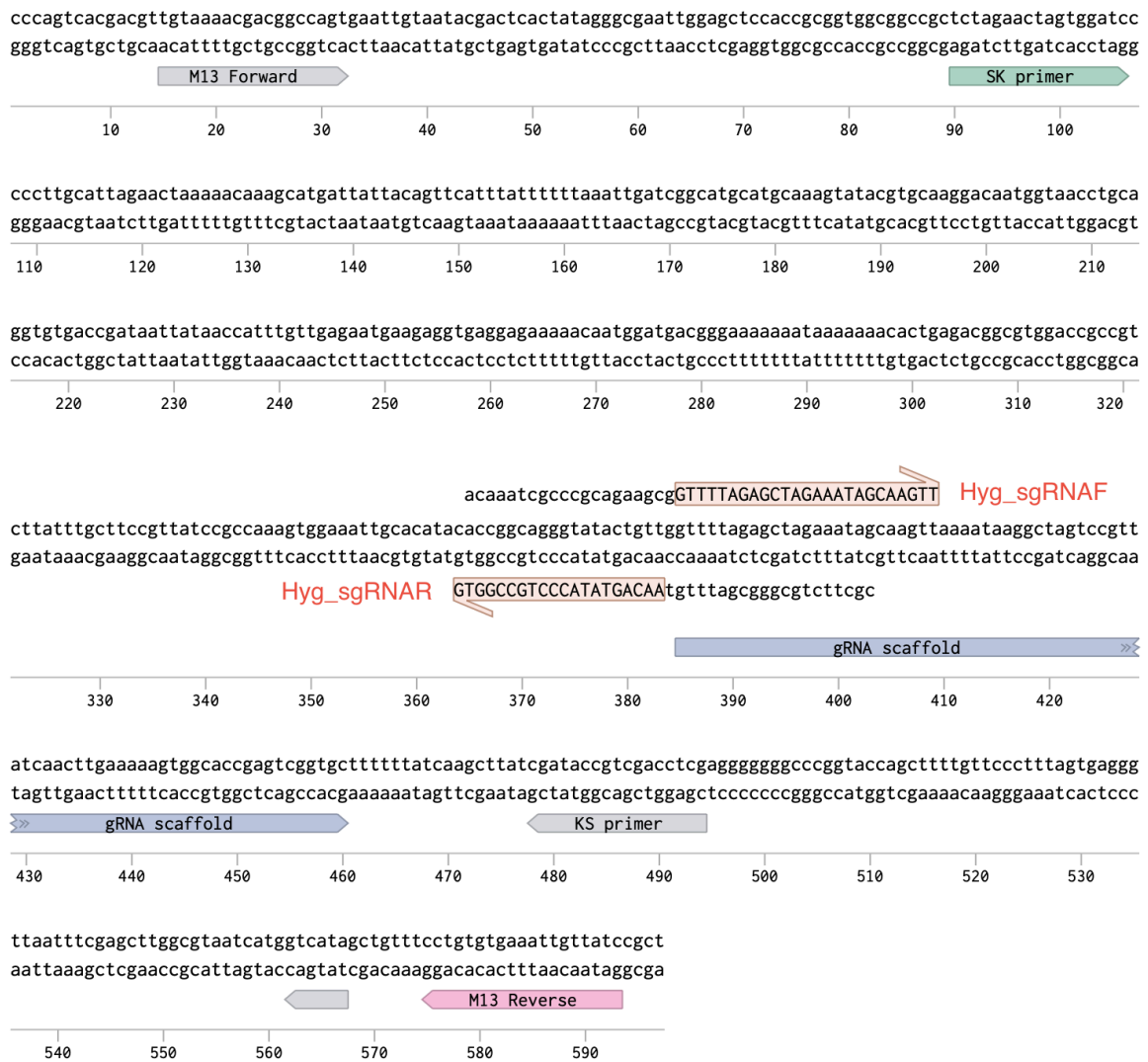


Figura 9. Esquema da obtenção do cassete de expressão de gRNA. A primeira etapa consiste em amplificar duas porções do cassete de expressão do gRNA que tinha como alvo o gene *hph* presente no mutante nulo *nop16*: (i) a porção do promotor associado ao gRNA com os *primers* M13 Forward e Hyg_sgRNAR (porção referente ao gRNA em minúsculo na sequência do *primer*) e (ii) a porção do gRNA associado ao terminador com os *primers* M13 Reverse e Hyg_sgRNAF (porção referente ao gRNA em minúsculo na sequência do *primer*). Os produtos de amplificação são então utilizados de molde para amplificação com os *primers* SK e KS.

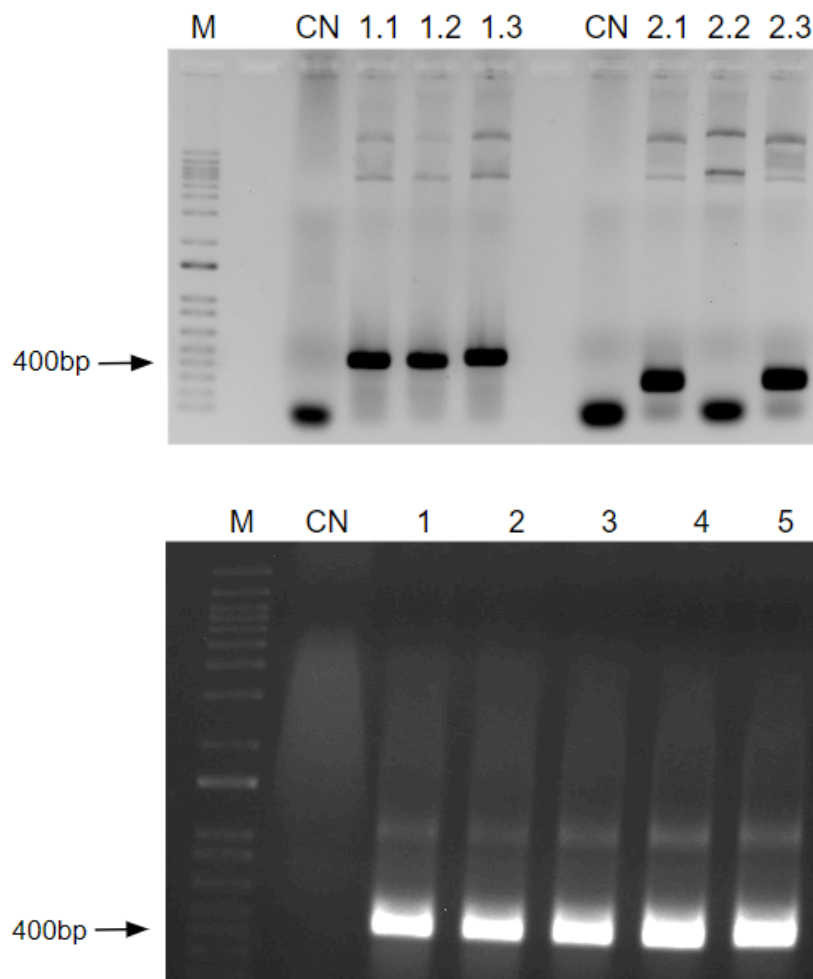


Figura 10. Construção do cassete de expressão de gRNA. O painel superior representa a obtenção dos *amplicons* referentes às hemiporções do cassete de expressão de gRNA. 1.1 a 1.3 correspondem aos fragmentos obtidos com a amplificação com os *primers* M13 Forward e Hyg_sgRNAR. 2.1 a 2.3 correspondem aos fragmentos obtidos com a amplificação com os *primers* M13 Reverse e Hyg_sgRNAF. O painel inferior representa a obtenção dos *amplicons* de fusão, obtidos pela mistura dos fragmentos obtidos com a amplificação com os *primers* M13 Forward e Hyg_sgRNAR e dos fragmentos obtidos com a amplificação com os *primers* M13 Reverse e Hyg_sgRNAF, seguidos de amplificação com os *primers* SK e KS. 1 a 5 reações independentes. CN, controle negativo.

Em seguida, a ideia seria testar a funcionalidade do sistema CRISPR na linhagem nula para o gene *nop16* com um cassete para expressão de outra marca de resistência, desta vez para nourseotricina (NAT). Para isso, foi realizada a amplificação, por PCR, da região codificante da marca de seleção para NAT (Fig. 11), a partir do plasmídeo pAI4 (Fig. 2).

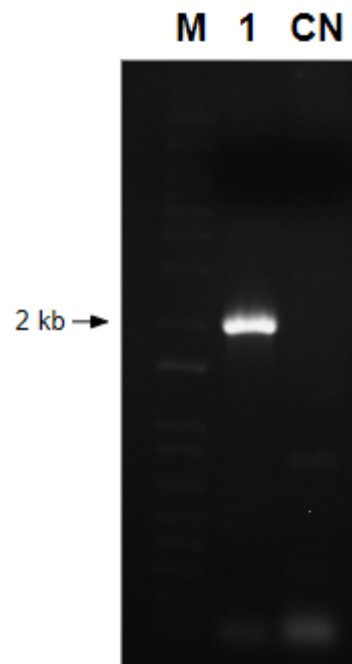


Figura 11. Amplificação da região codificante da marca de seleção para nourseotricina. O fragmento foi amplificado com *primers* específicos, sendo o resultado avaliado por eletroforese em gel de agarose. M, marcador de tamanho molecular 1 kb plus (Thermo Scientific); 1, amplificação do fragmento obtido; CN, controle negativo da reação. Número à esquerda representa o tamanho do *amplicon* baseado em comparação com o marcador de tamanho molecular.

Com a obtenção de todos componentes necessários foi possível realizar a transformação da linhagem nula, que foi realizada da seguinte maneira em três conjuntos: (i) apenas o cassete de expressão de NAT (2 μ g); (ii) cassete de expressão de NAT (2 μ g) juntamente com o cassete de expressão do gRNA (700 ng) e o plasmídeo pBHM2403 (4 μ g) e (iii) controle negativo. Após o tempo de incubação necessário, novamente, não foi observado nenhum crescimento de colônias transformantes. A sequência de não observação de colônias pode ter relação com a baixa eficiência de transformação, que pode estar associada a ajustes do equipamento de biolística, otimização das quantidades de material genético depositado ou ainda quantidade de células transformadas (Wang, 2021).

4. Conclusões

Foi possível construir um conjunto de moléculas para transformação genética de linhagens de *C. gattii*. Entretanto, é necessário realizar uma série de otimizações

para que o sistema CRISPR seja plenamente funcional em linhagens derivadas de *C. gattii* R265.

5. Reconhecimentos

Este trabalho foi financiado por bolsas das agências de fomento brasileiras Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 312994/2021-4) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS - 19/2551-0001708-1). CFS foi bolsista do CNPq. IDR foi bolsista FAPERGS.

6. Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

7. Contribuições dos Autores

CFS e CCS conceberam e o estudo; CFS e IDR conduziram os experimentos; CFS, IDR e CCS analisaram os dados; CFS, IDR e CCS escreveram o manuscrito; todos os autores leram e aprovaram a versão final.

8. Referências

ARRAS, S. D. M. et al. Targeted Genome Editing via CRISPR in the Pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PloS One**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. e0164322, 2016.

FALKOW, S. Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. **Reviews of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 10 Suppl 2, p. S274-276, 1988.

FAN, Y.; LIN, X. Multiple Applications of a Transient CRISPR-Cas9 Coupled with Electroporation (TRACE) System in the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. **Genetics**, [s. l.], v. 208, n. 4, p. 1357–1372, 2018.

FRASER, J. A. et al. Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 1036–1045, 2003.

FU, C. et al. Hot Fusion: An Efficient Method to Clone Multiple DNA Fragments as Well as Inverted Repeats without Ligase. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. e115318, 2014.

GOINS, C. L.; GERIK, K. J.; LODGE, J. K. Improvements to gene deletion in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*: absence of Ku proteins increases homologous recombination, and co-transformation of independent DNA molecules allows rapid complementation of deletion phenotypes. **Fungal genetics and biology: FG & B**, [s. l.], v. 43, n. 8, p. 531–544, 2006.

IDNURM, A. et al. *Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 420–429, 2004.

JUNG, K.-W. et al. Genetic Manipulation of *Cryptococcus neoformans*. **Current Protocols in Microbiology**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. e59, 2018.

SCHNEIDER, R. de O. et al. Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 10104, 2015.

SOREK, R.; LAWRENCE, C. M.; WIEDENHEFT, B. CRISPR-Mediated Adaptive Immune Systems in Bacteria and Archaea. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 237–266, 2013.

WANG, P. Genetic Transformation in *Cryptococcus* Species. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 56, 2021.

WARNOCK, D. W. *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 139, 1999.

ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 490–501, 2019.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi possível realizar a construção, de maneira rápida e eficiente, de todos os componentes necessários para utilização em transformações fazendo uso do sistema CRISPR. Como perspectivas, espera-se realizar os ajustes necessários no equipamento, repetir os testes de transformação usando outras abordagens visando aumento da taxa de transformação, como por exemplo a transformação por eletroporação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRAS, S. D. M. *et al.* A genomic safe haven for mutant complementation in *Cryptococcus neoformans*. **PloS One**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. e0122916, 2015.

ARRAS, S. D. M. *et al.* Targeted Genome Editing via CRISPR in the Pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PloS One**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. e0164322, 2016.

CASADEVALL, A. Amoeba provide insight into the origin of virulence in pathogenic fungi. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [s. l.], v. 710, p. 1–10, 2012.

CASTELLI, R. F. *et al.* Extracellular Vesicle Formation in *Cryptococcus deuterogattii* Impacts Fungal Virulence and Requires the NOP16 Gene. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 90, n. 8, p. e00232-22, 2022.

CASTRO E SILVA, D. M. *et al.* First isolation of *Cryptococcus neoformans* genotype VNI MAT-alpha from wood inside hollow trunks of *Hymenaea courbaril*. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 97–102, 2016.

CHEN, Y. *et al.* *Cryptococcus neoformans* Infection in the Central Nervous System: The Battle between Host and Pathogen. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 1069, 2022.

CHEN, S. C.-A.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 980–1024, 2014.

CHRISMAN, C. J. *et al.* Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 7, n. 5, 2011. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?scp=79958076329&partnerID=8YFLogxK>. Acesso em: 17 fev. 2024.

COX, G. M. *et al.* Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 166–175, 2001.

D'SOUZA, C. A. *et al.* Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. **mBio**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. e00342-00310, 2011.

DU PLOOY, L. M. *et al.* Functional Characterization of Cryptococcal Genes: Then and Now. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02263>. Acesso em: 2 fev. 2024.

FALKOW, S. Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. **Reviews of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 10 Suppl 2, p. S274-276, 1988.

FAN, Y.; LIN, X. An intergenic "safe haven" region in *Cryptococcus neoformans* serotype D genomes. **Fungal genetics and biology: FG & B**, [s. l.], v. 144, p. 103464, 2020.

FAN, Y.; LIN, X. Multiple Applications of a Transient CRISPR-Cas9 Coupled with Electroporation (TRACE) System in the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. **Genetics**, [s. l.], v. 208, n. 4, p. 1357–1372, 2018.

FEDER, V. *et al.* *Cryptococcus gattii* urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. **The FEBS Journal**, [s. l.], v. 282, n. 8, p. 1406–1418, 2015.

FIRACATIVE, C. *et al.* The status of cryptococcosis in Latin America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 113, p. e170554, 2018.

GRÖHS FERRAREZE, P. A. *et al.* Application of an optimized annotation pipeline to the *Cryptococcus deuterogattii* genome reveals dynamic primary metabolic gene clusters and genomic impact of RNAi loss. **G3 (Bethesda, Md.)**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. jkaa070, 2021.

HOWARD-JONES, A. R. *et al.* Pulmonary Cryptococcosis. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 1156, 2022.

HULL, C. M.; HEITMAN, J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Genetics**, [s. l.], v. 36, p. 557–615, 2002.

JIN, J.-H. *et al.* Genome-wide functional analysis of phosphatases in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 4212, 2020.

JUNG, K.-W. *et al.* Genetic Manipulation of *Cryptococcus neoformans*. **Current Protocols in Microbiology**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. e59, 2018.

LEE, K.-T. *et al.* Fungal kinases and transcription factors regulating brain infection in *Cryptococcus neoformans*. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1521, 2020.

LI, Y. *et al.* Identification and Characterization of an Intergenic "Safe Haven" Region in Human Fungal Pathogen *Cryptococcus gattii*. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 178, 2022.

LOFTUS, B. J. *et al.* The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 307, n. 5713, p. 1321–1324, 2005.

OLIVEIRA, D. L. *et al.* Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 1601–1609, 2010.

OLSZEWSKI, M. A. *et al.* Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 164, n. 5, p. 1761–1771, 2004.

PETTER, R. *et al.* A survey of heterobasidiomycetous yeasts for the presence of the genes homologous to virulence factors of *Filobasidiella neoformans*, CNLAC1 and CAP59bbThe GenBank accession numbers for the sequences determined in this work are AF337642, L22866, AF337643, AF337644 and AF337645. **Microbiology**, [s. l.], v. 147, n. 8, p. 2029–2036, 2001.

RAJASINGHAM, R. *et al.* Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet. Infectious Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 873–881, 2017.

SETIANINGRUM, F.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; DENNING, D. W. Pulmonary cryptococcosis: A review of pathobiology and clinical aspects. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 133–150, 2019.

SHAO, X. *et al.* An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v. 175, n. 5, p. 3244–3251, 2005.

WANG, Y. *et al.* A ‘suicide’ CRISPR-Cas9 system to promote gene deletion and restoration by electroporation in *Cryptococcus neoformans*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 31145, 2016.

WANG, P. Genetic Transformation in *Cryptococcus* Species. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 56, 2021.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-Dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s. l.], v. 38, n. 11, p. 2648–2650, 1994.

XU, X. *et al.* Clinical characteristics, *Cryptococcus neoformans* genotypes, antifungal susceptibility, and outcomes in human immunodeficiency virus-positive patients in Beijing, China. **The Journal of International Medical Research**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 03000605211016197, 2021.

YADAV, V. *et al.* Centromere scission drives chromosome shuffling and reproductive isolation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 117, n. 14, p. 7917–7928, 2020.

YADAV, V. *et al.* RNAi is a critical determinant of centromere evolution in closely related fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 115, n. 12, p. 3108–3113, 2018.

ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 490–501, 2019.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA “*GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY*”

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) The title page must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province, and country; different affiliations indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of up to 35 characters (including spaces); up to five key words; the corresponding author's name, full postal, postal, email address and ORCID ID.

b) The Abstract must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) The text must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use et al. List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (et al. should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a

unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Binomial Names: Latin names of genera, species and infraspecific taxa must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately following the References Section, not in the text.

The text includes the following elements:

Introduction - Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results - Undue repetition in text and tables should be avoided. Statistical analyses should be presented as complete as possible, i.e. not only P-values should be shown, but also all other test variables required for full appreciation of the results by the reviewers and readers. Comments on relevance of results are appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) The Acknowledgments must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) Conflict of Interest: Any possible conflict of interest must be disclosed here. If there is none, please state: The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicial to the impartiality of the reported research.

f) Authors Contributions: The contributions of each author must be specified here; identify authors by their initials. The style of this section may be as follows:

author initials> conceived and the study, <author initials> conducted the experiments (detail if necessary), <author initials> analyzed the data, <author initials> wrote the manuscript, <author initials> (other contributions if applicable), all authors read and approved the final version.

In case of doubts concerning contribution definitions, we suggest to consult the CRediT taxonomy at <https://casrai.org/credit>.

g) The References Section: References must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by et al. Use standard abbreviations for journal titles as suggested by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>).

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. “Personal communication” refers to information obtained from individuals other than the authors of the manuscript being submitted; “unpublished data” refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript under consideration. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.