

1 *Cryptococcus neoformans* é uma levedura patogênica que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos.  
2 O principal fator de virulência deste patógeno é a produção de uma cápsula polissacarídica que possui propriedades  
3 imunomodulatórias. O principal componente da cápsula é a glucuronoxilomanana (GXM), a qual é secretada para o  
4 meio extracelular através de vesículas e reincorporada a superfície da célula. Vias de secreção não convencional de  
5 GXM dependem da ação da proteína GRASP (*golgi reassembly and stacking protein*) em *C. neoformans*. Trabalhos  
6 recentes do nosso grupo demonstram que mutantes nulos de *C. neoformans* para o gene que codifica GRASP  
7 apresentam virulência atenuada e cápsula reduzida. O objetivo do presente trabalho é avaliar a localização subcelular  
8 de GRASP. Para tal, primeiramente utilizaremos a estratégia de purificação da proteína GRASP recombinante em  
9 modelo de expressão heteróloga em *Escherichia coli*. A proteína GRASP recombinante será utilizada para produção  
10 de anticorpos, os quais serão utilizados em ensaios de localização subcelular desta proteína em *C. neoformans*.  
11 Oligonucleotídeos foram projetados para a amplificação do cDNA de GRASP, o qual foi posteriormente clonado no  
12 vetor pCR2.1-TOPO. Este fragmente está em fase de subclonagem em vetor de expressão procariótico pET23d.  
13 Após clonagem, o vetor pET23d::GRASP será transformado por eletroporação em células de *E. coli* linhagem  
14 BL21(DE3). A purificação da proteína GRASP recombinante, fusionada a uma cauda de histidinas, será realizada  
15 por cromatografia de afinidade a níquel imobilizado. A produção de anticorpos anti-GRASP será fundamental para  
16 ensaios de localização desta proteína em *C. neoformans*, visando à elucidação de novas vias de secreção não  
17 convencionais neste patógeno.

18

19