

Adriana Corrêa da Silva^{1,2}, Charley Christian Staats^{2,3}, Augusto Schrank^{2,3}, Marilene Henning Vainstein^{2,3}

1 Acadêmica de Biomedicina UFRGS e Bolsista PIBIC/AF, 2 Centro de Biotecnologia e 3 Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Contato: adri_correasilva@yahoo.com.br

Introdução

Cryptococcus gattii e *Cryptococcus neoformans* são leveduras basidiomicéticas causadoras da criptococose, doença que pode ser adquirida pela via respiratória, tornando-se sistêmica, podendo atingir o sistema nervoso central (Huston, S. M., et al; 2009, Clin Chest Med). Para tanto, as proteínas da parede celular estão envolvidas na adesão ao epitélio pulmonar bem como a cápsula polissacarídica, já descrita como um fator de virulência envolvido na interação patógeno-hospedeiro (Doering, T. L. 2009, Annu Rev Microbiol), podem desempenhar funções essenciais na colonização do trato respiratório. Sendo assim, este estudo tem como objetivos identificar as proteínas de parede celular de *C. neoformans* e *C. gattii* envolvidas na adesão ao epitélio pulmonar.

Resultados

Partindo de resultados preliminares, já realizados neste projeto, tais como taxa de adesão de células leveduriformes ao epitélio pulmonar, desenvolvimento da cápsula durante co-cultivo com as células pulmonares e padronização e avaliação da viabilidade das células leveduriformes após digestão trípica, damos seguimento aos estudos proteômicos de *Cryptococcus* sp.

Proteínas identificadas por Espectrometria de Massas (Q-TOF).

As células de *C. neoformans* (linhagens selvagem B3501A e mutante acapsular CAP67) e *C. gattii*, R265, foram tratadas diretamente com tripsina, com incubação de 5min. Os peptídeos obtidos foram dessalinizados (Sistema OasisHLB-Waters) e analisados por Espectrometria de Massas (Q-TOF).

Espécie (Linhagem)	Total Identificado	Proteínas Consideradas
<i>Cryptococcus gattii</i> (R265)	93 proteínas	68 proteínas
<i>C. neoformans</i> (B3501A)	143 proteínas	67 proteínas
<i>C. neoformans</i> (CAP67)	100 proteínas	55 proteínas

Tabela 1. Proteínas Identificadas por Espectrometria de Massas após digestão trípica direta. A análise da espectrometria de massas, de amostras em triplicata biológica e duplicata técnica, foram realizadas pelo programa Mascot. Somente proteínas presentes em no mínimo quatro análises foram consideradas.

Quantificação Relativa entre as proteínas identificadas de *C. neoformans* pelo método RIBAR e xRIBAR.

Utilizamos um novo método descrito por Colaert, N. et al, que utiliza informações de algoritmos provenientes das informações obtidas por Espectrometria de Massas para realizar a comparação ao CAP67. A partir das informações obtidas, demonstradas no Gráfico 1, analisamos as proteínas conforme descrito nos próximos resultados.

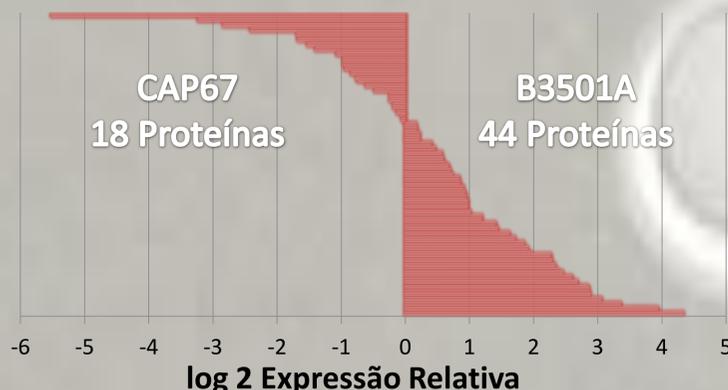


Figura 2. Presença de Peptídeo Sinal. Gráfico das proteínas diferentemente expressas em B3501A (valores positivos) em relação a CAP67 (valores negativos).

Avaliação da presença de peptídeo sinal das proteínas de *C. neoformans*.

A fim de mensurar a presença de peptídeo sinal, as sequências das proteínas identificadas pelo programa Mascot, foram analisadas pelo banco de dados do servidor SignalP. (Utilizando-se a listagem que segue o critério de quantificação relativa RIBAR e xRIBAR das proteínas das linhagens B3501A e CAP67).

Linhagem	Proteínas Identificadas	Presença de Peptídeo Sinal
B3501A	80 proteínas	7 proteínas
CAP67	47 proteínas	4 proteínas

Figura 2. Presença de Peptídeo Sinal. Quantificação quanto a peptídeo sinal sendo considerado a presença de no mínimo um valor de score do servidor SignalP (scores C, S and Y).

Classificação Funcional das proteínas identificadas conforme a presença de domínios conservados.

Com o intuito de classificar as proteínas de acordo com a sua Função Celular (a partir da listagem RIBAR e xRIBAR), foram categorizadas conforme o banco de dados de Domínios Com-servados NCBI. A confirmação desta classificação, foi realizada pelo BLASTp das sequências contra o banco de dados do Gene Ontology. Dessa forma, obtivemos a classificação representada pelo Gráfico 2.



Gráfico 1. Classificação Funcional de Proteínas conforme Domínios Conservados. Representação geral das proteínas de *C. neoformans*. A proporção da classificação da linhagem B3501A e o mutante acapsular CAP67, segue o mesmo padrão demonstrado neste perfil geral.

Homologia entre as proteínas identificadas por Espectrometria de Massas de *C. gattii* e *C. neoformans*.

A partir da identificação das proteínas, mostradas na Tabela 1 deste trabalho, realizamos uma procura nos bancos de dados nos quais o proteoma predito de *C. gattii* e *C. neoformans* estão depositados, (respectivamente Broad Institute e NCBI) a com o objetivo de analisar as proteínas ortologas entre as espécies de *Cryptococcus*. Os valores estão demonstrados no diagrama 1.

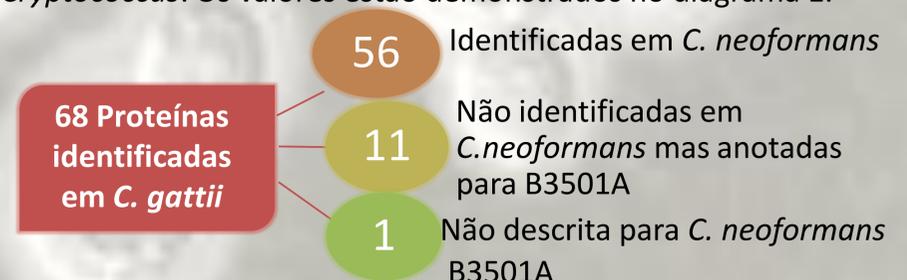


Diagrama 1. Proteínas identificadas em *C. gattii* com homologia para *C. neoformans*. Através do código das proteínas obtido pelo programa Mascot, as sequências foram comparadas por BLASTp.

Perspectivas

- Finalização da Análise de homologia entre as proteínas identificadas.
- Finalização da identificação das proteínas de superfície marcadas com Biotina e purificadas por coluna de Avidina (Termo Scientific)
- Confirmação da identidade das proteínas de superfície por métodos alternativos de isolamento de proteínas.
- Construção do mutante acapsular para *Cryptococcus gattii*.

Apoio

