

José Alex Lourenço Fernandes

Intein Prp8:
Potencial Terapêutico de um Elemento
Genético Invasivo

Natal, RN – Brasil

2018

José Alex Lourenço Fernandes

Intein Prp8:
Potencial Terapêutico de um Elemento Genético Invasivo

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

Centro de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Raquel Cordeiro Theodoro

Coorientador: Dr. Thales Domingos Arantes

Natal, RN – Brasil

2018

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Fernandes, José Alex Lourenço.

Intein Prp8: potencial terapêutico de um elemento genético invasivo / José Alex Lourenço Fernandes. - Natal, 2018.
145 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Cordeiro Theodoro.

Coorientador: Prof. Dr. Thales Domingos Arantes.

1. Splicing proteico - Dissertação. 2. Intein Prp8 - Dissertação. 3. Cryptococcus - Dissertação. 4. Saccharomyces - Dissertação. 5. Ura3 - Dissertação. 6. CnePrp8i - Dissertação. I. Theodoro, Raquel Cordeiro. II. Arantes, Thales Domingos. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 577

José Alex Lourenço Fernandes

Intein Prp8:
Potencial Terapêutico de um Elemento Genético Invasivo

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Qualificação aprovada. Natal, RN – Brasil, 19 de Novembro de 2018:

**Prof^ª. Dr^ª. Susana Margarida Gomes
Moreira**
Presidente desta banca – DBG/UFRN

**Prof. Dr. Leonardo Capistrano
Ferreira**
DBq/UFRN

**Prof. Dr. Paulo Marcos da Matta
Guedes**
DMP/UFRN

Natal, RN – Brasil
2018

José Alex Lourenço Fernandes

Intein Prp8:
Potencial Terapêutico de um Elemento Genético Invasivo

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Dissertação aprovada. Natal, RN – Brasil, 20 de Dezembro de 2018:

Prof^ª. Dr^ª. Raquel Cordeiro Theodoro
Orientadora deste trabalho
e presidente desta banca
DBG/UFRN

Prof. Dr. Gustavo Antônio de Souza
DBq/UFRN

**Prof^ª. Dr^ª. Lívia Kmetzsch Rosa e
Silva**
CBiot/UFRGS

Natal, RN – Brasil
2018

Dedico esta obra à minha avó, meus pais,
meu avô (*in memoriam*), meu irmão e demais
familiares e amigos que sempre se fizeram
presentes e me querem bem.

Agradecimentos

Este trabalho não seria possível sem a estreita e constante orientação da Prof^a. Dr^a. Raquel Cordeiro Theodoro. Ao Prof. Dr. Thales Domingos Arantes pelas grandes contribuições, discussões e críticas. E aos atuais e antigos membros do nosso grupo de pesquisa Andrea Oliveira, Conceição Castro, Felipe Gomes, Georggia Naliato, Indrid Goés, Kássia Galdino, Luanderson Pereira, Maria Fernanda Bezerra, Ronald Gomes e Rosy Daylla Rodrigues por tornarem o dia-a-dia no laboratório muito mais leve. Registro aqui, ainda, o meu especial agradecimento ao meu amigo, colega de graduação, pós-graduação e laboratório, Matheus Zatti que sempre embarca nos meus devaneios científicos e me deixa embarcar nos seus também; muito obrigado por me propiciar um ambiente tão rico, crítico e científico.

Aos integrantes e membros do Instituto de Medicina Tropical do Rio Grande do Norte e do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica, pelo uso do espaço, equipamentos e/ou reagentes durante a execução deste trabalho.

Fazer ciência de qualidade já é muito difícil, e no atual cenário político-social brasileiro é quase impossível. Este trabalho jamais seria possível sem as grandes colaborações estabelecidas. Agradeço sobremaneira à Prof^a Dr^a Livia Kmetzsch Rosa e Silva e à Prof^a Dr^a Marilene Henning Vainstein, ambas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela receptividade e por toda a ajuda para as subclonagens necessárias neste trabalho. Ao prof. Dr. Paul Liu e seu aluno Andy Song, ambos da Dalhousie University, pela receptividade e por toda a ajuda nos *Western Blots* iniciais deste trabalho. À Ms. Mariana Marchi Santoni, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” de Araraquara, pelos *Western Blots* finais – sem você este trabalho jamais estaria tão completo. À prof^a. Dr^a. Melanie Dobson, da Dalhousie University, por sua doçura e por todas as incríveis dicas no cuidado e manuseio de *Saccharomyces cerevisiae*. Ao prof. Dr. Claudio Slamovits e todos os membros de seu laboratório, também na Dalhousie University, pela imersão no mundo da evolução molecular e suas técnicas – não sou capaz de descrever a importância que

meu estágio com vocês impactou minha vida científica. À prof^a. Dr^a. Lucymara Fassarella Agnez Lima e prof^a. Dr^a. Sílvia Regina Batistuzzo de Medeiros, ambas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pelo uso do espaço laboratorial. Novamente, à prof^a. Dr^a. Sílvia Regina Batistuzzo de Medeiros pela incrível oportunidade do estágio assistido à docência – aprendi sobremaneira a arte da transmissão do conhecimento e de ensinar com excelência.

À minha família, pelo inestimável suporte durante todas as minhas jornadas acadêmicas e da vida.

Aos meus amigos Alan Keuce, Alexsandro Justino, Álvaro Tavares, Camila Leite, Eduardo Gandour, Georgina Andrezza Campos, Geraldo Ferreira, Glice Rocha Pires, Igor Marques, Isaías Chung, Jucélia Medeiros, Juliet Galego, Luana Caetano Silva, Lucas Otávio, Lucas Rocha, Luciana Brandão, Mayane Paulino, Mike Job Santos, Nitin Agrawal, Omar Valle, Paris Hanh Phuc, Pedro Augusto Machado, Phan Duong-Tien, Samara Leandro, Sandra Maria Fonseca Barreto, Tamires Leite, Vitor Vinícius, dentre tantos outros incontáveis, memoráveis e eternos. Como sempre digo, todos vocês exponenciam minha vida à enésima potência. Muito obrigado pelos risos, gargalhadas, viagens, almoços, jantares e por todos os momentos únicos que dividimos. Amo gigantesicamente cada um de vocês!

À vida que tem sido extremamente grata comigo e sempre coloca pessoas incríveis ao meu lado; pessoas estas que tanto de ensinam e me mostram tantas perspectivas diferentes.

Aos meus colegas de pós-graduação.

Aos excelentes professores com os quais tive a magnífica oportunidade de aprender, buscar e partilhar conhecimento. Não restrinjo aqui apenas aos professores da pós-graduação, incluo também todos aqueles que se fizeram essenciais desde do começo, no ensino pré-escolar. Não consigo me conceber sem vocês. Sempre carregarei um pouquinho de vocês comigo.

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte e ao Ministério da Educação por

fornecerem espaço, pessoal e viabilizarem uma educação de nível superior de qualidade.

Àquele que diariamente me espera e quase sempre me recebe de patas abertas, Paco. Sou eternamente grato por você sempre tornar meus dias mais alegres, mesmo com tantas preocupações.

Além disso, o suporte das agências federais de fomento à pesquisa (CAPES, CNPq e FINEP) e as concessões de bolsas

Aos professores membros da banca de qualificação e defesa deste trabalho que gentilmente designaram parte de seu tempo para leitura, correções e comentários que certamente serão de extrema valia.

Muito obrigado a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a execução deste trabalho.

*“It is a profound and necessary
truth that the deep things in science
are not found because they are useful;
they are found because it was possible
to find them.”*

Robert Oppenheimer

Resumo

Intein Prp8: Potencial Terapêutico de um Elemento Genético Invasivo.

Inteins são elementos genéticos invasivos que ocorrem inseridos em genes codificadores, normalmente constitutivos e essenciais, e que são transcritos e traduzidos juntamente à sequência hospedeira para então catalisarem seu próprio *splicing* proteico e reestabelecimento da conformação funcional da proteína hospedeira. Neste trabalho, foi criado um modelo experimental para a avaliação da função *splicing* do *intein* Prp8, em *Saccharomyces cerevisiae*, usando o gene *URA3* como hospedeiro do *intein* Prp8 do fungo patogênico *Cryptococcus neoformans* (CnePrp8i). Como este *intein* também ocorre em outros importantes patógenos fúngicos causadores de micoses cutâneas e sistêmicas e está ausente no genoma humano, ele é considerado um potencial alvo terapêutico uma vez que, tendo o seu *splicing* inibido, o *intein* permaneceria na proteína hospedeira inviabilizando seu funcionamento. Neste trabalho duas construções contendo o *intein* CnePrp8 foram testadas, sendo que em uma delas, foi possível observar o *splicing* do elemento e a manutenção da função de sua proteína hospedeira heteróloga, a Ura3. A presença do *intein* no RNAm foi confirmada por RT-PCR, e descartou-se a possibilidade de *splicing* a nível de RNAm. A presença da proteína foi confirmada por *Western Blot*; e sua função foi observada pelo crescimento em meios sintéticos completos sem histidina e uracila, e no meio 5-FoA. A Cisplatina já foi descrita como inibidora do *splicing* do *intein* RecA de *Mycobacterium tuberculosis* e por isso foi testada como um possível validador, mas observou-se pouca influência na inibição do *splicing* do *intein* no modelo proposto. A criação deste sistema heterólogo permitirá o teste de drogas que potencialmente inibam o *splicing* do CnePrp8i.

Palavras-chave: *splicing* proteico, *intein* Prp8, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, Ura3, CnePrp8i.

Abstract

Prp8 Intein: Therapeutic Potential of an Invasive Genetic Element.

Inteins are genetic mobile elements that occur inserted within protein-coding genes, which are, usually, housekeeping genes. They are transcribed and translated along with the host gene, then catalyze their own splicing from its host protein, re-establishing their functional conformation. We developed an experimental model to evaluate the splicing of Prp8 *intein* from the yeast pathogen *Cryptococcus neoformans* (CnePrp8i) in *Saccharomyces cerevisiae* Ura3 protein-coding gene as the non-native protein host for CnePrp8i. Since Prp8 inteins are found in several important fungal pathogens, causing from cutaneous to systemic mycosis, and are absent in mammals, they are considered potential therapeutic targets, because once their splicing is inhibited, the host protein would be no longer functional. Two different CnePrp8i-containing constructions were created and tested, although in only one of them the intein splicing was possible, as well as the full functionality of the host protein, the Ura3. In order to rule out any possible RNA splicing the presence of CnePrp8i at the mRNA level was confirmed by RT-PCR and the Ura3 expression was confirmed by cell grown on appropriate media (SC –His –Ura and 5-FoA media), as well as by western-blot. Cisplatin has been described as a RecA intein splicing inhibitor in *Mycobacterium tuberculosis* and therefore was tested as a possible validator, but it showed a low inhibition in our system. By using this heterologous system, new potential protein splicing inhibitors may be discovered and used in the future as a new class of drugs for mycosis treatment.

Keywords: Protein splicing, Prp8 intein, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, Ura3, CnePrp8i

Lista de ilustrações

Figura 1 – Incidência anual da criptococose no mundo.	28
Figura 2 – Divergência das espécies do gênero <i>Cryptococcus</i> e correlação entre os sorotipos, genótipos e espécies.	30
Figura 3 – Casos de criptococose na América Latica estratificados por genótipo.	31
Figura 4 – Visão geral dos <i>inteins</i>	33
Figura 5 – Tipos de <i>inteins</i> , sua mobilidade e ciclo <i>homing</i>	35
Figura 6 – Esquema geral das construções feitas neste trabalho.	40
Figura 7 – Esquema geral do padrão de crescimento das leveduras transformamentes em cada um dos meios em função do <i>splicing</i> do CnePrp8i colocado na Ura3	41
Figura 8 – Visão global do plasmídeo pRS313.	47
Figura 9 – Esquema para confirmação da correta ligação no pRS313.	48
Figura 10 – Esquema detalhado utilizado para inserção da primeira mutação sítio dirigida por PCR inverso.	52
Figura 11 – Esquema detalhado utilizado para inserção da segunda mutação sítio dirigida por PCR inverso.	53
Figura 12 – Análise da subclonagem por PCR de colônias com os <i>primers</i> M13.	67
Figura 13 – Resultados dos produtos da reação de digestão plasmidial com XhoI.	68
Figura 14 – Padronização da reação de PCR para a primeira mutação sítio dirigida.	69
Figura 15 – Gel de PCR de colônias bacterianas transformantes com o produto de ligação para produção do pRCT2Mut1.	71
Figura 16 – Gel do PCR de colônias bacterianas transformantes com o produto de ligação para produção do pRCT2Mut1, obtido com os <i>primers</i> Mut1F e Mut2R.	72
Figura 17 – Teste de sensibilidade à temperatura.	77
Figura 18 – Pontos de com maior influência da Cisplatina no <i>splicing</i> do CnePrp8i.	79
Figura 19 – Diferença do crescimento de 48 h para o de 24 h.	80

Figura 20 – RT-PCR com para o gene <i>URA3</i> de <i>S. cerevisiae</i>	81
Figura 21 – RT-PCR com para o CnePrp8i em <i>S. cerevisiae</i>	82
Figura 22 – Curva Padrão da quantificação pelo método de Bradford.	83
Figura 23 – Eletroforese de proteínas por SDS-Page com coloração por CBB	84
Figura 24 – SDS-PAGE corado com <i>InVision</i>	86
Figura 25 – <i>Western Blots</i> e sua quantificação relativa.	87

Lista de tabelas

Tabela 1 – Expectativa do padrão de crescimento das leveduras transformadas. . . .	41
Tabela 2 – Tamanhos dos <i>amplicons</i> esperados para o inserto e para o <i>intein</i> usando a abordagem de PCR Multiplex.	70
Tabela 3 – Padrão de crescimento das leveduras transformadas com o pRS313- \emptyset e as construções nos meios SC –His, SC –His –Ura e 5-FoA, após crescimento em 25 °C e 37 °C.	76
Tabela 4 – Tamanhos preditos das proteínas utilizadas neste trabalho.	85

Lista de abreviaturas e siglas

-His	Ausência de Histidina
-Ura	Ausência de Uracila
5-FoA	5-Fluoroorotic Acid (5-fluorouracil-6-carboxylic acid monohydrate)
6× <i>his-tag</i>	Cauda com seis resíduos do aminoácido histidina
AD1-7	Cepa AD1234567a de <i>S. cerevisiae</i>
AD1-9	Cepa AD123456789a de <i>S. cerevisiae</i>
ADE1	adenine deaminase
AIDS	acquired immune deficiency syndrome ou Síndrome da imunodeficiência adquirida
ARS	autonomously replicating sequence ou sequência de replicação autônoma
ATP	Adenosine Triphosphate ou Trifosfato de adenosina
BSA	Bovine serum albumin ou Soro Fetal Bovino
C-spl	Domínio Splicing C-terminal do Intein
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate ou Monofosfato cíclico de adenosina
CAN1	Plasma membrane arginine permease e sua ausência faz torna a levedura resistente a CANavanina
CBB	Coomassie Brilliant Blue ou Azul de Coomassie
cDNA	DNA complementar
CgaPrp8i	Intein da proteína Prp8 de <i>Cryptococcus gattii</i>
CgePrp8	Proteína Prp8 de <i>C. gattii</i>

CnePrp8	Proteína Prp8 de <i>Cryptococcus neoformans</i>
CnePrp8i	Intein da proteína Prp8 de <i>C. neoformans</i>
CO1	Construção Controle 1
CO2	Construção Controle 2
CO3	Construção Controle 3
CT1	Construção Teste 1
CT2	Construção Teste 2
CT2Mut1	Construção para controle negativo do splicing do CT2 com mutação em um dos resíduos essenciais para o Splicing
CT2Mut1	Construção para controle negativo do splicing do CT2 com mutação nos resíduos essenciais para o Splicing
DHPS	Deoxyhypusine synthase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DSB	double-strand break ou quebra da dupla fita de DNA
DST	Doenças Sexualmente Transmissível
DTT	Dithiothreitol
ECL	<u>E</u> nhanced luminol-based <u>c</u> hemiluminescent substrate ou substrato quimioluminescente melhorado à base de luminol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
eiF5a	Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A

EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
extein	Proteína hospedeira do Intein
FastaSeqBox	Caixas de texto utilizadas neste trabalho com sequências no formato Fasta
g/L	Unidade de medida – grama por litro
h	Unidade de medida – horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	<i>Homing</i> Endonuclease
HIS3	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase
HIV	human immunodeficiency virus ou vírus da imunodeficiência humana
Ho	Homothallic switching endonuclease
IBB-UNESP	Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
IC ₅₀	metade da concentração inibitória máxima
kb	Unidade de medida – kilo base pairs = 1,000 bp
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Unidade de medida – massa atômica de proteínas – kilodaltons
LB	Meio Luria-Bertani
LEU2	3-isopropylmalate dehydrogenase
M	Unidade de medida – Molar
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
<i>MAT</i>	Locus Mating-type

MBP	Maltose-binding protein
MCS	Multiple cloning site ou Sítio de clonagem múltipla
mg/L	Unidade de medida – miligramas por litro
mg/mL	Unidade de medida – miligramas por mililitro
MIC	Minimum inhibitory concentration ou Concentração inibitória mínima
mL	Unidade de medida – mililitro
mM	Unidade de medida – milimolar
mRNA	RNA mensageiro
N-spl	Domínio Splicing N-terminal do Intein
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Unidade de medida – nanograma
nm	Unidade de medida – nanômetro
O/N	<i>Overnight</i> ou durante a noite
°C	Unidade de medida – graus Celsius
p-value	Probability value ou Valor de probabilidade
pb	Unidade de medida – pares de base de DNA
PBS	Phosphate-buffered saline ou Tampão fosfato-salino
PBST	PBS com Tween 20
PCR	Polymerase chain reaction ou Reação em cadeia da polimerase
PEG ₄₀₀₀	Poly(ethylene glycol) ou Polietilenoglicol – polímero com 4000 repetições

pH	Unidade de medida – Potencial hidrogeniônico
PKC	Protein kinase C ou Proteína quinase C
PLAC	protease
pRCO1	Construção Controle 1 clonada no pRS313
pRCO2	Construção Controle 2 clonada no pRS313
pRCO3	Construção Controle 3 clonada no pRS313
pRCT1	Construção Teste 1 clonada no pRS313
pRCT2	Construção Teste 2 clonada no pRS313
pRCT2Mut1	Construção para controle negativo do splicing do CT2 com mutação em um dos resíduos essenciais para o Splicing clonada no pRS313
pRCT2Mut1	Construção para controle negativo do splicing do CT2 com mutação nos resíduos essenciais para o Splicing clonada no pRS313
Prp8	Proteína pre-mRNA Processing 8
PRP8	Gene pre-mRNA Processing 8
pRS313-∅	pRS313 vazio
RadA	DNA repair protein RadA
RecA	Recombinase A
RNA	Ribonucleic acid ou ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _t	RNA transportador
RNS	Reactive nitrogen species ou Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Reactive oxygen species ou Espécies reativas de oxigênio

rpm	Rotations per minute ou rotações por minuto
RT-PCR	Reverse transcription PCR ou reação da Transcriptase reversa seguida de PCR
SC	Meio de cultura – Synthetic Complete ou Sintético Completo
SDS	Sodium dodecyl sulfate ou Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
snRNP	small nuclear ribonucleoproteins ou Pequenas Ribonucleoproteínas Nucleares
Spl	Domínio Splicing do Intein
SSD1	Suppressor of SIT4 Deletion
ssDNA	single-stranded DNA ou DNA de fita simples
SufB	Ferrous sulfide cluster assembly protein B
SVL82	Mesmo que a cepa W303 de <i>S. cerevisiae</i>
T4	Ligase isolada do bacteriófago T4
TE	Tampão com Tris e EDTA
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane ou tris(hidroximetil)aminometano
Tris-HCl	Tris com Ácido clorídrico
TRP1	Phosphoribosylanthranilate isomerase
U5	RNA não-codante componente do spliceossomo
ug/mL	Unidade de medida – micrograma por mililitro
URA3	Orotidine-5'-phosphate (OMP) decarboxylase
Ura3	Orotidine-5'-phosphate (OMP) decarboxylase

Vma	Vacuolar ATPase subunit ou Subunidade Vacuolar ATPase
VMA1	Gene codante da Vma
W3O3	Cepa <i>S. cerevisiae</i>
W3O3-∅	Cepa W3O3 não-transformada
W3O3-pRS313	Cepa W3O3 transformada com o pRS313
W3O3-pRCO1	Cepa W3O3 transformada com o pRCO1
W3O3-pRCO2	Cepa W3O3 transformada com o pRCO2
W3O3-pRCO3	Cepa W3O3 transformada com o pRCO3
W3O3-pRCT1	Cepa W3O3 transformada com o pRCT1
W3O3-pRCT2	Cepa W3O3 transformada com o pRCT2
W3O3-pRCT2Mut1	Cepa W3O3 transformada com o pRCT2Mut1
WHO	World Health Organization ou Organização Mundial da Saúde
XhoI	Primeira enzima de restrição isolada de <i>Xanthomonas holcicola</i>
YPD	Meio de cultura – Yeast Extract - Peptone - Dextrose

Lista de símbolos

α	alfa
Δ	Letra grega minúscula delta
μ	Letra grega <i>mu</i> – micro

Sumário

1	INTRODUÇÃO	26
1.1	<i>Cryptococcus</i> e a Criptococose	27
1.2	<i>Inteins</i>	33
2	OBJETIVOS	39
2.1	Objetivo Geral	39
2.2	Objetivos Específicos	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	Funcionamento do Sistema	40
3.2	Plasmídeos, Construções Controle e Construções Teste	42
3.3	Subclonagens e Verificação das Construções	47
3.4	Construção do Plasmídeo pRCT2Mut1	50
3.5	Meios de Cultura para <i>S. cerevisiae</i>	54
3.6	Transformação de <i>S. cerevisiae</i>	56
3.7	Avaliação da Função <i>splicing</i> do <i>Intein CnePrp8</i> e da Funcionalidade da Proteína Ura3	58
3.7.1	Teste de Crescimento e Sensibilidade à Temperatura	58
3.7.2	Influência da Cisplatina no <i>splicing</i> do <i>Intein CnePrp8</i> em Ura3	59
3.8	Análise da Expressão Gênica	60
3.8.1	Análise da transcrição do RNA Mensageiro (Transcrição Reversa e PCR)	60
3.8.2	Análise da Proteína Ura3 Expressa (Extração Proteica e Detecção Proteica)	62
4	RESULTADOS	66
4.1	Subclonagens e Confirmação das Construções	66
4.2	Construção Do Plasmídeo pRCT2Mut1	69
4.3	Transformação de <i>S. cerevisiae</i>	74

4.4	Avaliação da Função <i>splicing</i> do <i>Intein CnePrp8</i> e da Funcionalidade da Proteína <i>Ura3</i>	75
4.4.1	Crescimento e Sensibilidade à Temperatura das Leveduras Transformadas Nos Meios SC –His, SC –His –Ura e 5-FoA	75
4.4.2	Influência da Cisplatina no <i>splicing</i> do <i>Intein CnePrp8</i> em <i>Ura3</i>	78
4.5	Análise da Expressão Gênica	81
4.5.1	Análise do RNA Mensageiro Transcrito (Transcrição Reversa e PCR)	81
4.5.2	Análise da Proteína <i>Ura3</i> Expressa (Extração Proteica e Detecção Proteica)	83
5	DISCUSSÃO	88
6	CONCLUSÃO	97
	REFERÊNCIAS	98
	APÊNDICES	115
	APÊNDICE A – ALINHAMENTO DA URA3 NATIVA E DAS CONSTRUÇÕES PRCO1, PRCO2 E PRCT1.	116
	APÊNDICE B – ALINHAMENTO DA URA3 NATIVA E DAS CONSTRUÇÕES PRCO1, PRCO3, PRCT2 E PRCT2MUT1.	117
	APÊNDICE C – TESTE DE SENSIBILIDADE À TEMPERATURA PARA TODAS AS COLÔNIAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO.	118
	APÊNDICE D – CRESCIMENTO AO LONGO DO TEMPO, COM ESTRATIFICAÇÃO POR CONCENTRAÇÃO DE CISPLATINA.	137

APÊNDICE E – SUMARIZAÇÃO DO <i>P</i> -VALUE DOS CRESCIMENTO DAS LEVEDURAS NOS DIFERENTES MEIOS APRESENTADOS NA FIGURA 19.	139
APÊNDICE F – CONCENTRAÇÃO DE TODAS AS AMOSTRAS DAS EXTRAÇÕES PROTEICAS QUANTIFICADAS PELO MÉTODO DE BRADFORD; ALÉM DO DETALHAMENTO DOS MEIOS UTILIZADOS PARA CRESCIMENTOS DAS CÉLULAS E OD ₆₀₀ DAS CULTURAS.	140
ANEXOS	142
ANEXO A – COAUTORIA EM ARTIGO NÃO-DIRETAMENTE RELACIONADO À ESTA DISSERTAÇÃO	143

1 Introdução

Estima-se que mais de 1,5 milhão de pessoas morrem todos os anos por doenças fúngicas e mais de 1 bilhão são infectadas (BONGOMIN et al., 2017). Apenas três classes de antifúngicos estão disponíveis no mercado, mas com notória resistência frequente, crescente e global (FISHER et al., 2018). Ainda assim, estas drogas podem causar graves efeitos colaterais ao paciente (como hepatotoxicidade e nefrotoxicidade), principalmente os derivados poliênicos e os imidazólicos (FANOS; CATALDI, 2000; JESSICA C SONG, 2005; SOMCHIT et al., 2004; WANG et al., 2010; YANG; RANKIN, 1985). Avanços em pesquisas com fungos são necessários urgentemente, sendo assim, inúmeros autores e pesquisadores já demonstraram este pensamento em publicações como o recente editorial “Stop neglecting fungi” de 2017, publicado na *Nature Microbiology*. Neste cenário, pesquisas que busquem identificar novos e seguros alvos terapêuticos tem grande importância científica e trazem impactos socioeconômicos significativos.

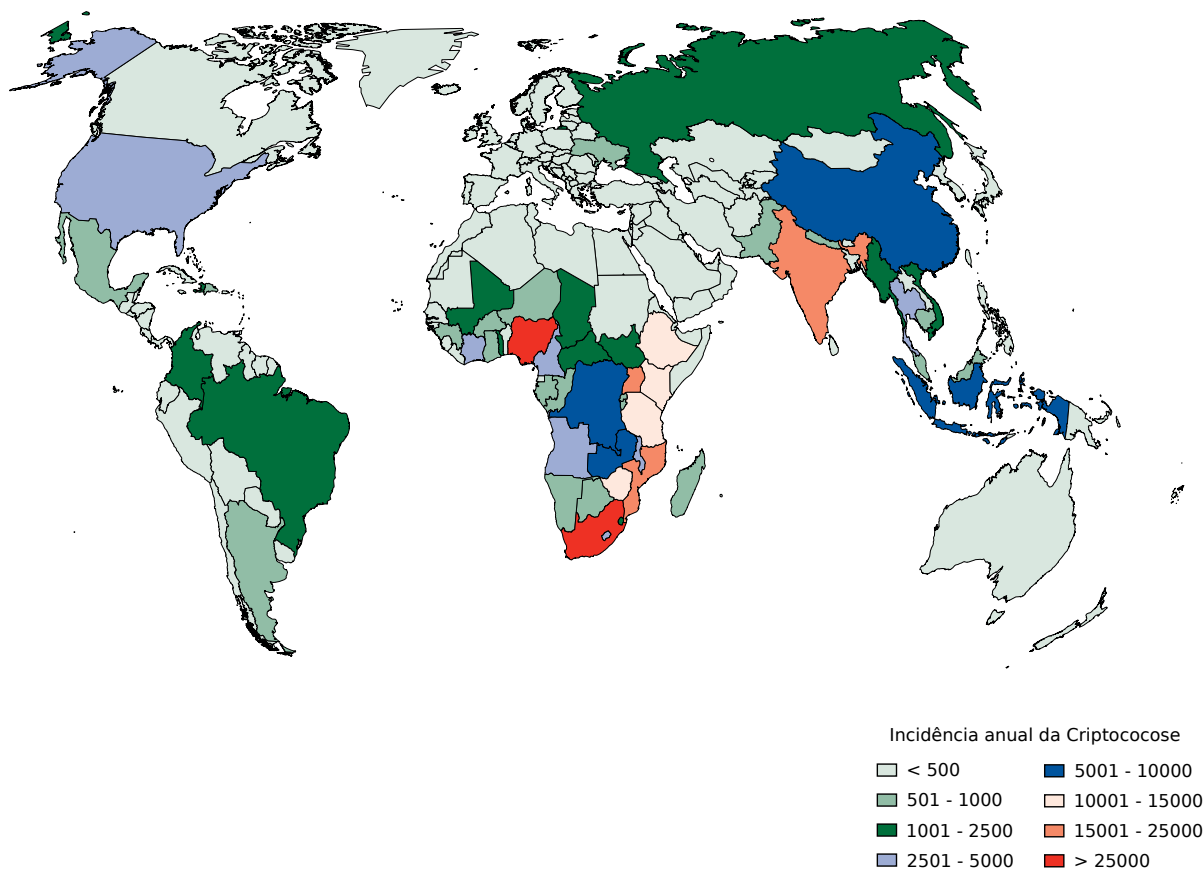
1.1 *Cryptococcus* e a Criptococose

Criptococose é o nome atribuído à doença causada pelo agente etiológico *Cryptococcus* sp., atingindo indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos. A infecção por fungos do gênero *Cryptococcus* pode ter rápida evolução e levar os indivíduos infectados à morte. Em humanos, a infecção acontece por inalação do fungo que está no ambiente, em saprobiose. Os pulmões são o primeiro sítio de infecção, e como o *Cryptococcus* sp. mostra alto neurotropismo, comumente os pacientes infectados evoluem para a meningite criptocócica (FIRACATIVE et al., 2018; MAY et al., 2016; PARK et al., 2009). Os pacientes mais susceptíveis são os que apresentam quadros de imunodeficiência (KÖHLER; CASADEVALL; PERFECT, 2015). Sendo assim, pacientes com infecções por HIV são um grupo de extrema importância (FIRACATIVE et al., 2018); estima-se que anualmente cerca de um milhão de casos de meningite criptocócica ocorram neste grupo, o que resulta em aproximadamente 624.700 mortes nos três primeiros meses pós infecção (PARK et al., 2009). Além disso, surtos de criptococose em indivíduos imunocompetentes podem ser observados; como, por exemplo, o surto em Vancouver, British Columbia, Canadá (BYRNES III et al., 2009; KIDD et al., 2007; MACDOUGALL et al., 2007).

Um estudo mais recente, utilizando metodologias diferentes, demonstra que as espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* matam mais de 180.000 pessoas por ano (RAJASINGHAM et al., 2017) (Figura 1); o que mesmo assim coloca a criptococose como a quinta doença infecciosa que mais causa mortes no mundo, atrás apenas da AIDS, tuberculose, malária e mortes associadas à diarreia (RODRIGUES, 2018; WHO, 2016, 2017, 2018).

A criptococose por *Cryptococcus neoformans* ocorre como a primeira infecção oportunista em aproximadamente 4,4% dos pacientes com AIDS no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE et al., 1999). Infecções por *C. neoformans* associada a pacientes com quadro de AIDS predominam nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil e o grupo mais afetado é o de indivíduos do sexo masculino entre 20 e 30 anos (FERNANDES et al., 2000). Nas regiões Norte e Nordeste do Brasil ocorrem casos de criptococose em indivíduos sem evidência de imunodepressão, tanto no sexo masculino quanto no feminino, HIV

Figura 1 – Incidência anual da criptococose no mundo.



Fonte: modificado de RAJASINGHAM et al., 2017.

negativos, causados por *Cryptococcus gattii*, sendo considerada uma endemia regional. A meningoencefalite criptocócica ocorre em nativos destas regiões, incluindo jovens e crianças, com elevada morbidade e mortalidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE et al., 2012).

O tratamento convencional da criptococose é feito com anfotericina B, droga com reconhecida ação nefrotóxica que requer internação do paciente, itraconazol e fluconazol (KWON-CHUNG; EDMAN; WICKES, 1991; LACAZ et al., 2002; PERFECT et al., 2010; PERFECT; BICANIC, 2015), sendo que todos estes fármacos foram desenvolvidos antes dos anos 1990 e, mesmo depois de quase três décadas, pouca coisa mudou. Sobre o desenvolvimento de drogas antifúngicas, um recente trabalho de revisão de patentes de antifúngicos mostrou que o desenvolvimento de drogas contra *Cryptococcus* é escasso;

além disso não é concentrado em nenhuma classe de moléculas ou alvos, denotando a grande complexidade de gerar novas drogas antifúngicas (SANTOS-GANDELMAN; RODRIGUES; MACHADO SILVA, 2018). Devido à ausência de tratamentos específicos e livres de efeitos colaterais para os pacientes, pesquisas, como a deste projeto, que busquem alvos terapêuticos alternativos, são promissoras.

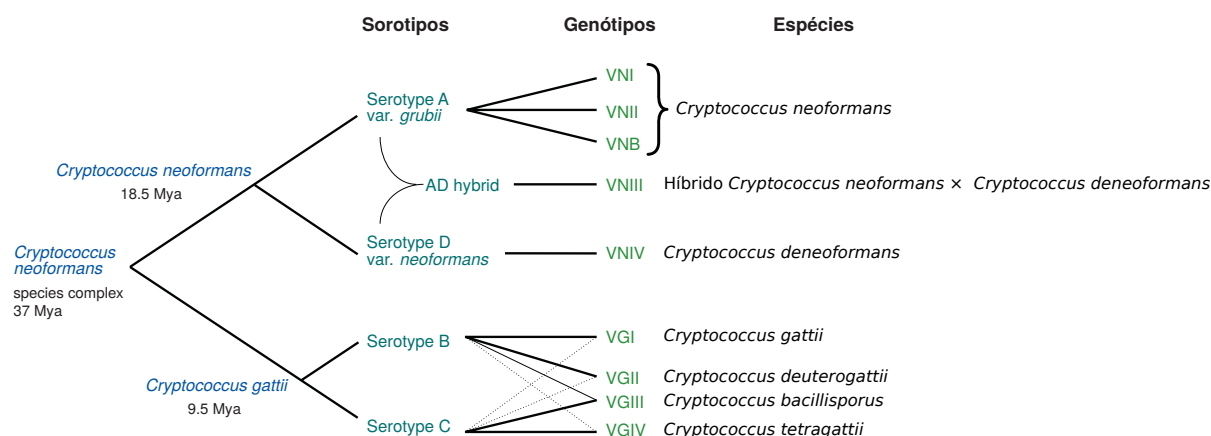
C. neoformans e *C. gattii* são as espécies de importância clínica do gênero *Cryptococcus*; sendo, respectivamente, a primeira mais associada com infecções em indivíduos imunocomprometidos e a segunda espécie mais associada com infecções em indivíduos imunocompetentes. Anteriormente, ambas espécies eram divididas em sorotipos e atualmente em genótipos, e tal divisão é amplamente relacionada à sua origem geográfica e virulência.

A espécie *C. neoformans* é de distribuição mundial; no ambiente, estas leveduras costumam ser encontradas onde existem aves, pois suas excretas que ricas em fontes de nitrogênio (como ácido úrico, ureia e creatinina), criam condições favoráveis ao crescimento fúngico; notoriamente áreas urbanas com focos de pombos são ambientes e propícios (KON et al., 2008; KWON-CHUNG; BENNETT, 1984). Já a espécie *C. gattii* é mais frequente em regiões tropicais e subtropicais, mas também encontrada em regiões de clima temperado e frio (FRANZOT; SALKIN; CASADEVALL, 1999); sendo aparentemente pertencente de forma natural à Austrália e associada a material vegetal em decomposição de *Eucalyptus camaldulensis*, uma espécie nativa daquele país (ELLIS; PFEIFFER, 1990), apesar de já ter sido isolada de outras espécies vegetais (KON et al., 2008).

Com os importantes avanços alcançados na área de sistemática e evolução ao longo das últimas décadas (como o desenvolvimento de ferramentas de alinhamento mais rápidas, precisas e robustas; importantes avanços nas áreas de genômica e proteômica; introdução da filogenômica e filoproteômica), foi possível estudar o gênero *Cryptococcus* sob um novo olhar e, de fato, ter uma melhor noção sobre sua estrutura populacional e de espécies. Anteriormente apenas dividia-se este gênero em sorotipos (POLLOCK; WARD, 1962; WILSON; BENNETT; BAILEY, 1968); com a introdução de técnicas moleculares, passou-se a dividi-lo em genótipos (BRANDT et al., 1995; CRAMPIN et al., 1993; CURRIE; FREUNDLICH; CASADEVALI, 1994; LIN; HEITMAN, 2006; MEYER et al., 1999, 2003;

SPITZER; SPITZER, 1994; VARMA; KWON-CHUNG, 1992); e atualmente vários destes genótipos foram reconhecidos como espécies através de sofisticadas técnicas moleculares e de filogenia (HAGEN et al., 2015) (Figura 2). Apesar da notória importância deste avanço para estudos epidemiológicos e correlações com a patogenia e prognóstico, isto não foi muito bem-aceito por toda a comunidade científica: enquanto alguns avaliam esta mudança como muito positiva, alguns outros importantes grupos de pesquisa na área argumentam que, mesmo com o reconhecimento destas 7 espécies, não se contempla a ampla diversidade genética já conhecida para este gênero e separá-las em novas espécies apenas traria mais problemas para a rotina clínico-laboratorial (CASADEVALL et al., 2017; HAGEN et al., 2017; IDNURM; LIN, 2015; KWON-CHUNG et al., 2017).

Figura 2 – Divergência das espécies do gênero *Cryptococcus* e correlação entre os sorotipos, genótipos e espécies.

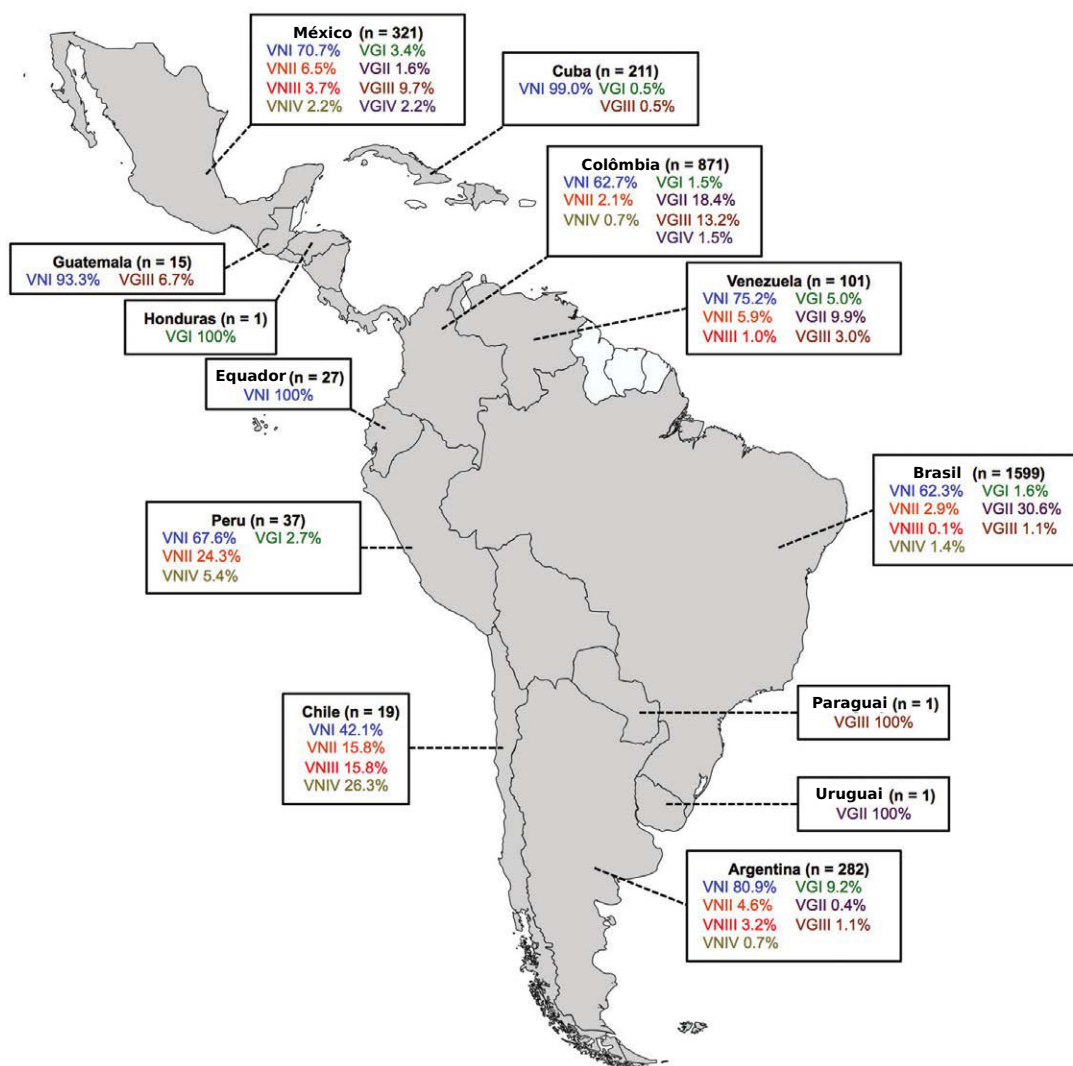


Fonte: modificado de LIN; HEITMAN, 2006, com inclusão de dados de HAGEN et al., 2015.

No mundo, a espécie *C. neoformans* é responsável por 72,17% das infecções, sendo que destas 83,23% é relacionado ao genótipo VNI (dados gerados a partir de dados publicados por COGLIATI, 2013). Na América Latina, todos os países da registram casos de criptococose, sendo, também, o genótipo VNI o mais frequente (Figura 3).

Dentre os fatores de virulência responsáveis pela patogenicidade de *Cryptococcus* spp. os mais bem descritos são: (i) produção de uma cápsula polissacarídica que inibe a

Figura 3 – Casos de criptococose na América Latina estratificados por genótipo.



Fonte: modificado de FIRACATIVE et al., 2018.

fagocitose (BULMER; SANS, 1967; KOZEL; GOTSCHLICH, 1982) e, quando não a inibe, impede que a célula fúngica seja danificada (ZARAGOZA et al., 2008); (ii) habilidade de crescer como levedura à 37° C, temperatura do corpo humano (BULMER; SANS; GUNN, 1967); (iii) produção de melanina que o protege de estresses ambientais (KWON-CHUNG; RHODES, 1986); (iv) produção de fosfolipases (CASADEVALL; COELHO; ALANIO, 2018; COX et al., 2001; DJORDJEVIC, 2010; LEV et al., 2013); (v) produção de ureases (COX et al., 2000; FU et al., 2018; SINGH et al., 2013); (vi) amplas redes de sinalização

extremamente complexas e orquestradas, como proteína quinase A/AMP cíclico (cAMP), proteína quinase C (PKC)/proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), cascatas de sinalização lipídicas e a vias de sinalização cálcio-calcineurina (KOZUBOWSKI; LEE; HEITMAN, 2009); (vii) além de uma série de importantes adaptações fisiológicas que estas leveduras precisam desempenhar ao passar da fase saprobiótica para patogênica, com notórias mudanças na biodisponibilidade de micro e macronutrientes (BALLOU; JOHNSTON, 2017).

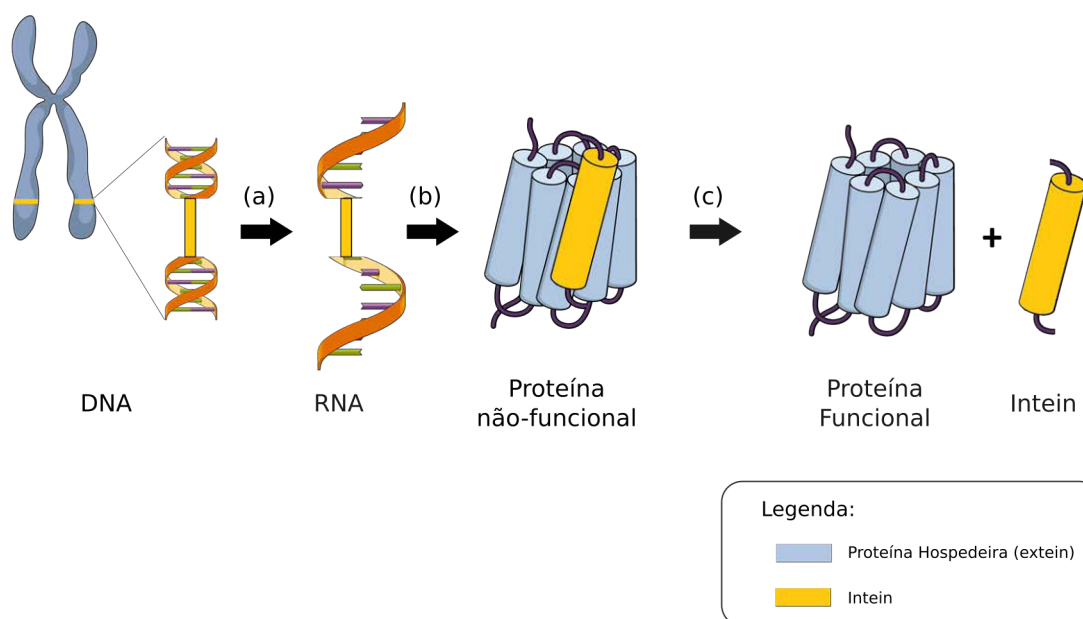
O locus *mating type* também é muito estudado por possuir importantes fatores de virulência. Em *Cryptococcus* existe dois *mating types* (a e α , determinados pelo loci *MAT*), o *mating type* α é o mais encontrando em pacientes acometidos por *Cryptococcus* sp., chegando a mais de 94% dos casos no Brasil, por exemplo (OHKUSU et al., 2002); o que está de acordo com o padrão observado no mundo, além de se já ter evidenciado experimentalmente maior virulência do *mating type* α em relação ao *mating type* a (KWONCHUNG; EDMAN; WICKES, 1992). Uma explicação plausível é que o loci *MAT* é uma grande região (~ 100kb) que contém aproximadamente 20 genes, dos quais vários codificam proteínas sem nenhuma função aparente no *mating* (LENGELER et al., 2002), mas podem desempenhar importante função na virulência (DESJARDINS et al., 2017; NIELSEN; KWON-CHUNG, 2011).

Com esta explanação sobre o status atual da criptococose e de *Cryptococcus*, fica claro que a busca por novos alvos terapêuticos específicos e seguros é urgente. Neste intuito este projeto visou o estudo de uma classe de elementos genéticos móveis, os *inteins*; estes elementos estão presentes em muitos fungos patogênicos, mas estão ausentes no genoma de organismos multicelulares, sendo então potenciais alvos terapêuticos.

1.2 *Inteins*

Inteins são sequências codificadoras transcritas e traduzidas junto a sequência flanqueadora (*extein*) que sofrem um *splicing* (excisão) proteico autocatalítico. As sequências protéicas flanqueadoras são unidas por uma ligação peptídica, formando uma proteína funcional (GOGARTEN et al., 2002) (Figura 4).

Figura 4 – Visão geral dos *inteins*.



Fonte: autoria própria.

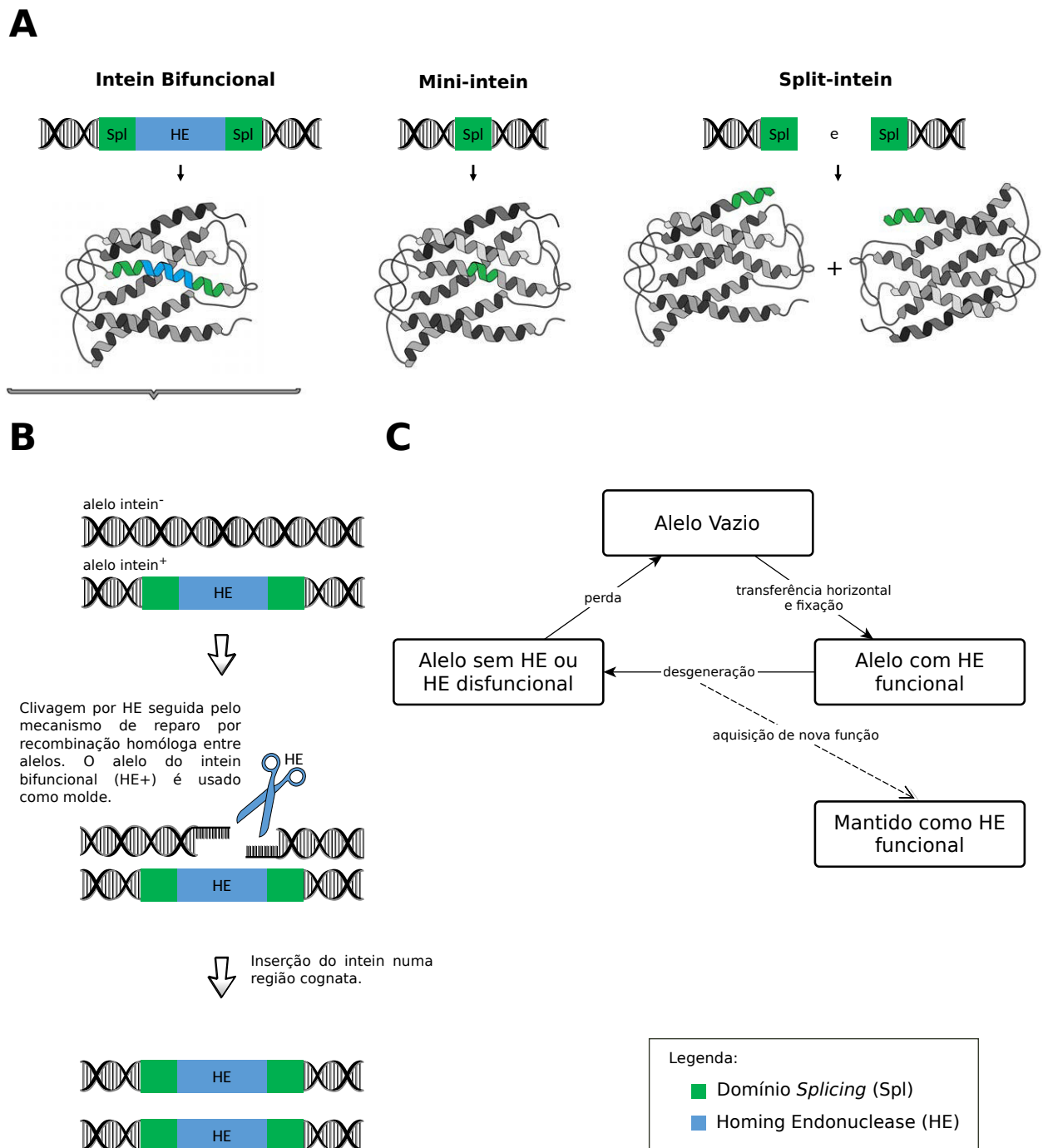
Inteins são elementos genéticos invasivos, anteriormente tidos como “parasitas”, que ocorrem inseridos em genes codificadores, geralmente constitutivos e essenciais. Eles são (a) transcritos e (b) traduzidos com o gene hospedeiro para então (c) catalisarem seu próprio *splicing* proteico, reestabelecendo, assim, a conformação funcional da proteína hospedeira.

Os estudos com *inteins* iniciaram-se em 1988 através da comparação de sequências da Vma de *Neurospora crassa* e a de *Daucus carota*, sendo que o *intein* estava presente em *N. crassa* e ausente em *D. carota* (BOWMAN; TENNEY; BOWMAN, 1988; ZIMNIAK et al., 1988). Este mesmo gene homólogo em *S. cerevisiae* foi descrito como um possível transportador de cálcio, apesar de já se ter observado a grande homologia deste com a Vma (SHIH et al., 1988). No entanto, em 1990 se demonstrou que a sequência extra ao gene da Vma de *S. cerevisiae*, mesmo transcrita e traduzida, removia-se à nível proteico

(HIRATA et al., 1990); e em 1994, após a descrição de inúmeras outras sequências, em vários reinos, que também eram capazes de fazer auto-excisão a nível proteico, um grupo de pesquisadores que trabalhavam na área propuseram o uso do nome *intein* (referente à “*internal proteins*”) para designá-las (PERLER et al., 1994).

Para melhor compreensão dos *inteins*, é comum classificá-los em três grupos diferentes: *inteins* bifuncionais, *mini-inteins* e *split-inteins* (FERNANDES et al., 2016; NOREN; WANG; PERLER, 2000) (Figura 5A). *Inteins* bifuncionais são aqueles em que é possível encontrar uma *Homing* Endonuclease (HE) dentro deles; possuir uma HE funcional faz com que eles se espalhem rapidamente em uma população por um padrão de herança super-mendeliano (LIU, 2000) (Figura 5B). Quando toda a população possuir o *intein*, os domínios HE não oferecem vantagens, podendo degenerar e comumente se perder; como o *intein* restante é menor que seu ancestral, é chamado *mini-intein*, ou seja, os *mini-inteins* não possuem a HE, tendo, portanto, um domínio *splicing* contínuo. No entanto, há exceções importantes nesse padrão da HE, a mais conhecida é a endonuclease Ho, que é uma *homing* endonuclease que inicia o processo de conversão de *mating type* nos *Saccharomycetales*. A Ho é codificada por um gene independente, mas mostra mais de 50% de similaridade de sequência primária com o *intein* Vma encontrado neste grupo, portanto acredita-se que Ho evoluiu de uma HE que degenerou e ganhou uma nova função e por isso retida (BAKHRAT et al., 2004). Este processo completo é conhecido como “ciclo *homing*” (BURT; KOUFOPANOU, 2004; GOGARTEN; HILARIO, 2006; KOUFOPANOU; BURT, 2005) (Figura 5C). Já o terceiro, os *split-inteins*, são os mais raros e são essencialmente *mini-inteins* divididos em duas proteínas diferentes do mesmo organismo. Quando eles são traduzidos, as partes divididas sofrem uma reação *trans-splicing*, ligando as duas proteínas hospedeiras diferentes em apenas uma, ou seja, os *split-inteins* são basicamente *mini-inteins* cujas partes N e C terminais estão separadas, flanqueando genes distintos e, após a tradução, as porções N e C terminais se unem, sofrem o *splicing* e ligam seus *exteins* por uma reação de *trans-splicing* proteico (CHONG; XU, 2005; WU; HU; LIU, 1998). Sendo que apenas *mini-inteins* na proteína Prp8 foram identificados em espécies patogênicas do complexo *Cryptococcus* (BUTLER; POULTER, 2005; THEODORO; BAGAGLI, 2009).

Figura 5 – Tipos de *inteins*, sua mobilidade e ciclo *homing*.



Fonte: modificado de BURT; KOUFOPANOU, 2004 e FERNANDES et al., 2016.

(a) *Inteins* bifuncionais, *mini-inteins* e *split-inteins*; (b) mobilidade do *intein*: DSB por HE e reparo por recombinação homóloga; e (c) modelo do ciclo *homing* com ganho, degeneração e perda de HE em populações hospedeiras.

Inteins podem ser encontrados nos três grandes domínios: archaea, bacteria e eukarya; além dos vírus (GREEN; NOVIKOVA; BELFORT, 2018; NOVIKOVA et al., 2016; NOVIKOVA; TOPILINA; BELFORT, 2014). Geralmente ocorrem em sítios conservados de genes constitutivos e importantes para a sobrevivência ou reprodução do organismo hospedeiro (NAGASAKI et al., 2005). Acredita-se que tais genes, com baixas taxas mutacionais, preservariam os sítios de reconhecimento das HE, enquanto genes com altas taxas se tornariam rapidamente imunes às HE (LIU, 2000).

Como o *splicing* ocorre tanto *in vitro* quanto *in vivo*, os *inteins* também são extremamente importantes para o campo da biotecnologia, sendo aplicados em muitos processos diferentes, como por exemplo: expressão e purificação de proteínas sem adição de tags (COOPER et al., 2018), ciclização de proteínas (XU; EVANS, 2001), componente principal de biossensores (JEON et al., 2018; TOPILINA; MILLS, 2014) e, recentemente, estão sendo aplicados no desenvolvimento de um novo ensaio de interação proteína-proteína (STAGLJAR, 2015). Uma outra importante aplicação dos *inteins* é seu uso como marcador genético para identificação de espécies, pois os *inteins* podem exibir diferenças moleculares entre espécies muito próximas (GARCIA GARCES; CORDEIRO; BAGAGLI, 2017; PRANDINI et al., 2013; RAJASEKHARAN et al., 2018).

Desde sua descoberta, os *inteins* sempre foram descritos como meros elementos genéticos parasitas (GOGARTEN; HILARIO, 2006), unicamente por sua característica de mobilidade e causar heranças super-mendelianas. À época, estas eram as características mais marcantes, observadas e pesquisadas nestes elementos; mas, à luz da evolução, qual o motivo de um elemento tão grande ser mantido em proteínas tão importantes para correto funcionamento de uma célula? Por qual motivo uma célula gastaria mais energia para mantê-los? Será que apesar destas características, sua presença não traz algum benefício para os organismos em que estes são encontrados? Melhor investigando estas perguntas e vendo o real papel do *intein* no *fitness* de alguns organismos que os possuem, chegou-se a algumas importantes evidências: o *intein* pode ter *splicing* modulado por pH, processo redox, estresse oxidativo, estresse nitrosativo, estresse osmótico, temperatura, danos no DNA e assim sinalizar, de algum modo, para a célula ativar

determinadas vias bioquímicas (LENNON; BELFORT, 2017; LENNON; STANGER; BELFORT, 2016); eles podem funcionar como uma espécie de interruptor da proteína hospedeira e controlar sua função pelos mesmos mecanismos acima explicitados (CIRAGAN et al., 2016; NICASTRI et al., 2013; NOVIKOVA et al., 2016; NOVIKOVA; TOPILINA; BELFORT, 2014; PAVANKUMAR, 2018; TOPILINA et al., 2015a, 2015b); eles podem ser mediadores na produção de novos arranjos proteicos e assim produzir proteínas com diferentes estruturas, e possivelmente, diferentes funções – colocando os inteins como os agentes ativos de uma espécie de *splicing* alternativo à nível proteico que funciona como uma estratégia que leva a uma maior diversidade de proteínas sem qualquer modificação à nível genético (ARANKO; WLODAWER; IWAĬ, 2014). Tais observações abrem um amplo leque de novas possibilidades que podem ser exploradas futuramente.

O *intein* Prp8 ocorre no gene *PRP8*, o qual codifica a proteína Prp8, uma das maiores e mais conservadas proteínas nucleares, apresentando cerca de 60% de similaridade entre leveduras e humanos. Esta proteína ocupa uma posição central na porção catalítica do spliceossomo, sendo um dos componentes da U5 do snRNP (small nuclear Ribonucleoprotein) envolvido em vários rearranjos moleculares cruciais para o *splicing* dos íntrons dos pré-RNA mensageiros, passo essencial para a expressão gênica; portanto, a Prp8 é essencial para as células sobreviverem (GRAINGER; BEGGS, 2005). A inibição do *splicing* do *intein* Prp8 como um novo tratamento antifúngico já foi proposta (LIU; YANG, 2004).

O *intein* Prp8 está esporadicamente distribuído em todos os filós do reino Fungi (GREEN; NOVIKOVA; BELFORT, 2018; PERLER, 2002) e inclui espécies de importância médica, causadoras de micoses sistêmicas, como *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Emmonsia parva*, *Blastomyces dermatitidis*, *C. neoformans* e *C. gattii*, de dermatomicoses como espécies dos gêneros *Microsporium* e *Trichophyton* bem como espécies de importância fitossanitária, como *Botrytis* spp. (BUTLER et al., 2006; BUTLER; GOODWIN; POULTER, 2001; BUTLER; POULTER, 2005; MONIER et al., 2013; THEODORO et al., 2011).

Ambas as espécies patogênicas, *C. neoformans* e *C. gattii*, possuem um mini-*intein*

no gene *PRP8* (pre-mRNA processing factor 8), e ambos os *inteins*, CnePrp8i e CgaPrp8i, apresentam os resíduos de aminoácidos essenciais para o correto *splicing* (BUTLER et al., 2006; BUTLER; GOODWIN; POULTER, 2001).

O *intein* Prp8 das espécies patogênicas fúngicas é um potencial alvo terapêutico, já que uma vez seu *splicing* inibido, a proteína Prp8 resultante não seria mais funcional, interrompendo assim a sobrevivência e proliferação fúngica (LIU; YANG, 2004). O fato de não existir *inteins* no genoma humano faz deles alvos terapêuticos potencialmente seguros. O tratamento da infecção criptocócica é um desafio, uma vez que os fármacos atualmente disponíveis são nefrotóxicos (FANOS; CATALDI, 2000; TIPHINE; LETSCHER-BRU; HERBRECHT, 1999; YANG; RANKIN, 1985) e hepatotóxicos (JESSICA C SONG, 2005; SOMCHIT et al., 2004; WANG et al., 2010). Outro problema importante é o aumento do número de cepas resistentes que infectam seres humanos (KANO et al., 2017; PERFECT; COX, 1999; SMITH et al., 2015). Nesse cenário, pesquisar e elucidar novos alvos terapêuticos específicos pode levar a um marco importante no tratamento da criptococose e outras doenças fúngicas. *Inteins* são promissores alvos terapêuticos, pois (i) ocorrem em fungos, (ii) nunca foram encontrados em mamíferos, (iii) ocorrem dentro de importantes proteínas para a função da célula, (iv) seu *splicing* correto é extremamente necessário para que a proteína hospedeira possa desempenhar suas funções, (v) são conservados mesmo em genótipos de *Cryptococcus* raros e altamente divergentes, (vi) e possuem um mecanismo de *splicing* extremamente conservado evolutivamente.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Criação de um sistema heterólogo para fácil avaliação da função *splicing* do *intein* Prp8 de *C. neoformans* em *Saccharomyces cerevisiae*, usando o gene *URA3* como hospedeiro não nativo do *intein*, que possa ser aplicado na busca de fármacos que inibam o *splicing*

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos delineados neste trabalho foram:

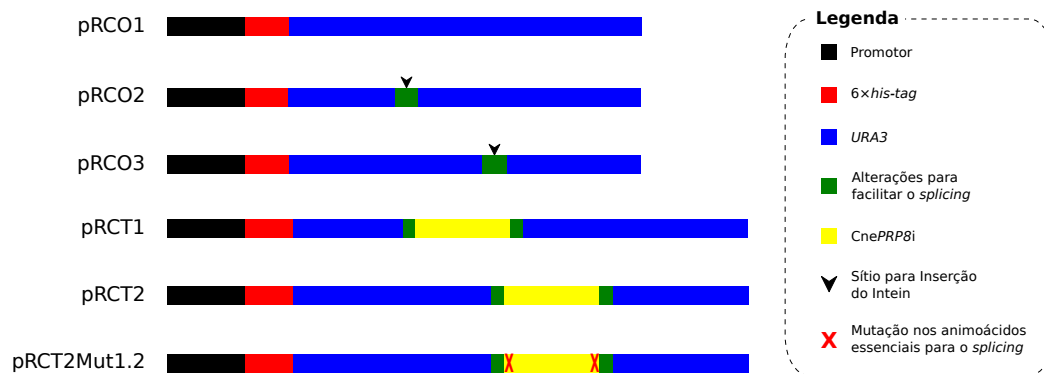
- i. Subclonar as construções controles e as construções com o *intein* do plasmídeo pUC57 para o pRS313;
- ii. Construir o plasmídeo pRCT2Mut1 que não permite *splicing* do *intein*;
- iii. Transformar as cepas W303 de *S. cerevisiae* com as construções controle, com as construções contendo o *intein* e com o plasmídeo pRS313-Ø.
- iv. Avaliar a expressão do gene *URA3* em função da ocorrência ou da ausência do *splicing* do *intein* CnePrp8;
- v. Analisar a expressão de *URA3* por RT-PCR do RNAm e por *Western Blot*; e
- vi. Testar a Cisplatina, que sabidamente é inibidora do *splicing* de outros *inteins*, no sistema proposto. Sendo esta uma espécie de validação do sistema proposto.

3 Materiais e Métodos

3.1 Funcionamento do Sistema

Para avaliar o *splicing* proteico do CnePrp8i em um sistema heterólogo, utilizou-se a cepa W303 de *S. cerevisiae*, o plasmídeo pRS313 com seis construções (com quatro construções controles e duas construções com o *intein*) e meios específicos. No planejamento das construções, levou-se em consideração a importância da porção flanqueadora ao *intein* (o *extein*) para permitir o ataque nucleofílico e posterior *splicing*, de modo que a diferença entre as construções com o *intein* baseia-se no local de inserção deste e sua relação com os aminoácidos originais da proteína Ura3 – sendo o local de inserção da 6×*his-tag* igual para todos, na porção N-terminal da proteína Ura3 (Figura 6).

Figura 6 – Esquema geral das construções feitas neste trabalho.



Fonte: autoria própria.

O sistema funciona da seguinte maneira: se o *splicing* proteico ocorrer, a proteína Ura3 voltará à sua conformação original e será funcional; se não acontecer, ela não será funcional. No cultivo em meio *Synthetic Complete* sem histidina (SC –His), há o crescimento das leveduras transformadas com o plasmídeo pRS313 com os insertos ligados; no meio *Synthetic Complete* sem histidina e uracila (SC –His –Ura), há o crescimento das leveduras com a proteína Ura3 funcional; já no meio *Synthetic Complete* sem histidina, com baixa concentração de uracila e acrescido de ácido 5-Fluoroorótico (5-FoA), há o

crescimento apenas das leveduras com a proteína Ura3 não funcional, ou seja, trata-se de um sistema de seleção positiva (SC -His -Ura) e negativa (5-FoA). A expectativa do padrão de crescimento de cada uma das construções é reportada na Tabela 1. O padrão de crescimento está intrinsecamente ligado ao *splicing* do intein CnePrp8 colocado na Ura3, que pode ter sua atividade (produção de uracila endógena) observada em meios apropriados (Figura 7).

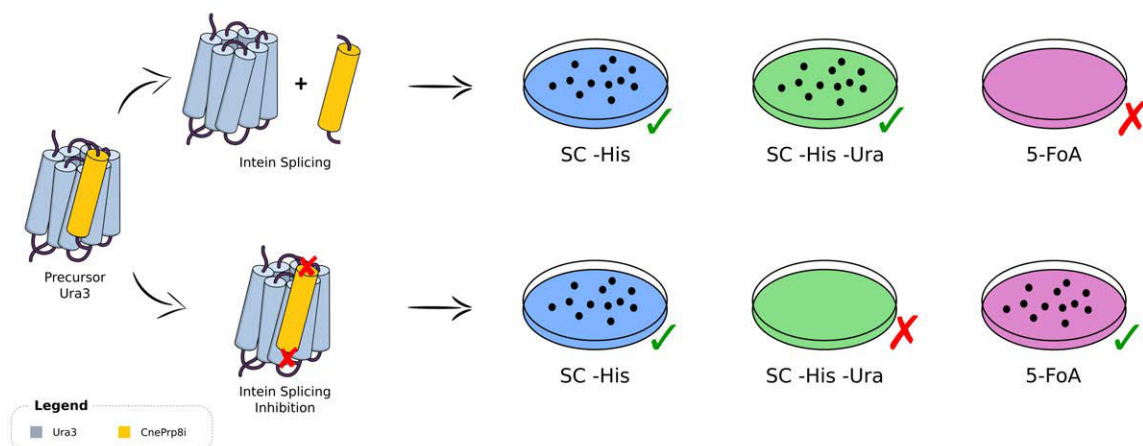
Tabela 1 – Expectativa do padrão de crescimento das leveduras transformadas.

Construções	Meios de Crescimento		
	SC -His	SC -His -Ura	5-FoA
pRS313-∅	✓	✗	✓
pRCO1	✓	✓	✗
pRCO2	✓	✓	✗
pRCO3	✓	✓	✗
pRCT1	✓	✓	✗
pRCT2	✓	✓	✗
pRCT2Mut1.2	✓	✗	✓

Fonte: autoria própria.

Nota: O ✗, em vermelho, mostra que não há expectativa de crescimento para esta construção no respectivo meio; já o ✓, em verde, mostra que há expectativa de crescimento para esta construção no respectivo meio

Figura 7 – Esquema geral do padrão de crescimento das leveduras transformantes em cada um dos meios em função do *splicing* do CnePrp8i colocado na Ura3



Fonte: autoria própria.

3.2 Plasmídeos, Construções Controle e Construções Teste

Com exceção da construção controle pRCT2Mut1 (construção com *intein* mutado incapaz de sofrer *splicing*), a qual foi realizada por mutação sítio dirigida, as demais foram desenhadas e então sintetizadas pela empresa GenScript (Piscataway, NJ, USA); sendo duas construções contendo o gene *URA3* (região promotora e região codificadora) com o *intein* (CT1 e CT2) e três construções controle (*URA3* sem o *intein*) (CO1, CO2 e CO3).

Em todas as construções uma $6\times his$ -tag (tag de hexa-histidina) foi inserida na porção codificadora da parte N-terminal da proteína Ura3. As duas construções testes (CT1 e CT2) diferenciam-se apenas quanto ao local de inserção dos resíduos nativos do *extein* e *intein*, além da relação desse com os aminoácidos originais da proteína (Figura 6). Para cada construção teste, há uma construção controle específica, além do controle para a $6\times his$ -tag: sendo o CO2 controle do CT1, o CO3 controle do CT2 e o CO1 controle da $6\times his$ -tag (Figura 6). Os controles das construções teste possuem apenas os resíduos do *extein*, que nas construções testes foram inseridos junto ao *intein* no gene *URA3* (obedecendo ao local de inserção do *intein* nas construções teste), com a finalidade de verificar se tais resíduos influenciam na atividade da enzima. A seguir estão esquematizadas as sequências de aminoácidos codificadas pelas construções ¹.

A visão global dos sítios escolhidos para inserção do *intein* na Ura3 nativa são representados pelo sinal de “~”, conforme indicado no FastaSeqBox 1.

¹ Deste ponto em diante, os FastaSeqBox aqui inseridos tem formatação obedecendo aos seguintes critérios:

- i. A sequência da $6\times his$ -tag é representada com fonte em vermelho;
- ii. A sequência do CnePrp8i é representada em fonte azul;
- iii. Os locais de inserção do *intein* CnePrp8i na Ura3 de *S. cerevisiae* são representados com um sinal de “~” (til);
- iv. As mutações sítio dirigidas são evidenciadas com fonte em vermelho, negrito e sublinhado;
- v. As demais representações são tratados no próprio texto.
- vi. Alinhamentos múltiplos (MSA) foram utilizados para melhor representar as relações dos aminoácidos entre as construções teste e as construções controle (Apêndice A e Apêndice B).

>Ura3^a

MSKATYKERAATHPSPVA AKLFNIMHEKQTNLCASLD
 VRTTKELLELVEALGPKICLLKTHVDILTDFSMEGTVK
 PLKALSAKYNFLLFEDRKFADIGNTVKLQYSAGVYRIA
 E ~ **W**A DITNAHG VVGPGIVSGLKQA AEEVTKEPRGLL
 M LAELSC **K G** ~ **S L S T G E** YTKGTVDIAKSDKDFVIGFI
 AQRDMGGRDEGYDWLIMTPGVGLDDKGDALGQQYRT
 VDDVVSTGSDIIIVGRGLFAKGRDAKVEGERYRKAGW
 EAYLRRCGQQN*

^a **FastaSeqBox 1:** Sequência de aminoácidos nativos da Ura3 com ênfase nos sítios de inserção do *intein*.

Para a construção 1 (CT1), introduziu-se apenas 4 resíduos de aminoácidos extras da Prp8 de *C. neoformans* (**KASG**), com o resíduo “W” do *C-extein URA3* sendo similar ao “F” encontrado no *extein* nativo (Prp8) (indicado no FastaSeqBox 2).

>CT1^a

M G S H H H H H H MSKATYKERAATHPSPVA AKLFNIMHE
 KQTNLCASLDVRTTKELLELVEALGPKICLLKTHVDIL
 TDFSMEGTVKPLKALSAKYNFLLFEDRKFADIGNTVK
 LQYSAGVYRIAE **K A** **C L Q N G T R L L R A D G S E V L V E D V Q E**
G D Q L L G P D G T S R T A S K I V R G E E R L Y R I K T H E G L E D L V C
T H N H I L S M Y K E R S G S E R A H S P S A D L S L T D S H E R V D V T V
D D F V R L P Q Q E Q Q K Y Q L F R S T A S V R H E R P F T S K L D T T L
L R I N S I E L E D E P T K W S G F V V D K D S L Y L R H D Y L V L H N S G
 WADITNAHG VVGPGIVSGLKQA AEEVTKEPRGLLMLA
 ELSCKGSLSTGEYTKGTVDIAKSDKDFVIGFIAQRDMG
 GRDEGYDWLIMTPGVGLDDKGDALGQQYRTVDDVVS
 TGSDIIIVGRGLFAKGRDAKVEGERYRKAGWEAYLRRC
 CGQQN*

^a **FastaSeqBox 2:** Sequência de aminoácidos codificados pela Construção 1 (CT1).

Para a construção 2 (CT2) inseriu-se uma mutação no N-*extein* Ura3 para trocar-se o aminoácido G para A, além da adição do aminoácido G no C-*extein*-Ura3 no sítio

KGSLSTGE indicado abaixo em negrito (o local de inserção na Ura3 pode ser visto no FastaSeqBox 1). Tal sítio é parte de uma região de *loop* na periferia da interface de dímero da Ura3. Com a modificação aqui proposta, a construção seria k**A**<*intein*>s**G**lstge) (as marcas rosa e azul correspondem, respectivamente, aos resíduos do N e C-*extein* modificados que flanqueiam o *intein* CnePrp8i), a qual tem uma mudança conservativa de G para A (ambos aminoácidos apolares) no N-*extein* Ura3 e um único resíduo (G) inserido após o *intein*, no C-*extein* Ura3 (indicado no FastaSeqBox 3).

>CT2^a

```

M G S H H H H H H MSKATYKERAATHPSPVAAKLFNIMHEK
QTNLCASLDVRTTKELLELVEALGPKICLLKTHVDILT
DFSMEGTVKPLKALSAKYNFLLFEDRKFADIGNTVKLQ
YSAGVYRIAEWADITNAHG VVGPGIVSGLKQA AEEVT
KEPRG LLM LAELSCK A CLQNGTRLLRADGSEVLVEDV
Q E G D Q L L G P D G T S R T A S K I V R G E E R L Y R I K T H E G L E D L
V C T H N H I L S M Y K E R S G S E R A H S P S A D L S L T D S H E R V D V
T V D D F V R L P Q Q E Q Q K Y Q L F R S T A S V R H E R P F T S K L D T T
L L R I N S I E L E D E P T K W S G F V V D K D S L Y L R H D Y L V L H N S
G LSTGEYTKGTVDIAKSDKDFVIGFIAQRDMGGRDEG
YDWLIMTPGVGLDDKGDALGQQYRTVDDVVSTGSDIII
VGRGLFAKGRDAKVEGERYRKAGWEAYLRRCGQQN*

```

^a **FastaSeqBox 3:** Sequência de aminoácidos codificados pela Construção 2 (CT2).

Para todas as construções teste fez-se os respectivos controles sem o *intein*, mas com a manutenção do *extein* e as respectivas modificações. Sendo que os seguintes controles foram desenhados:

- i. Controle 1 (CO1) contendo o gene *URA3* nativo, com $6 \times his\text{-tag}$, sem o *intein* e sem demais modificações (indicado no FastaSeqBox 4);

>CO1^a

M G S H H H H H H H M S K A T Y K E R A A T H P S P V A A K L F N I M H E
 K Q T N L C A S L D V R T T K E L L E L V E A L G P K I C L L K T H V D I L
 T D F S M E G T V K P L K A L S A K Y N F L L F E D R K F A D I G N T V K
 L Q Y S A G V Y R I A E W A D I T N A H G V V G P G I V S G L K Q A A E E
 V T K E P R G L L M L A E L S C K G S L S T G E Y T K G T V D I A K S D K
 D F V I G F I A Q R D M G G R D E G Y D W L I M T P G V G L D D K G D A L
 G Q Q Y R T V D D V V S T G S D I I I V G R G L F A K G R D A K V E G E R
 Y R K A G W E A Y L R R C G *

^a **FastaSeqBox 4:** Sequência de aminoácidos codificados pelo Controle 1 (CO1).

- ii. Controle 2 (CO2) contendo o gene *URA3* nativo, com 6×*his-tag*, sem o *intein* e com adição dos aminoácidos KASG inseridos na construção 1, ou seja, o controle CO2 é o controle direto do CT1 (indicado no FastaSeqBox 5);

>CO2^a

M G S H H H H H H H M S K A T Y K E R A A T H P S P V A A K L F N I M H E
 K Q T N L C A S L D V R T T K E L L E L V E A L G P K I C L L K T H V D I L
 T D F S M E G T V K P L K A L S A K Y N F L L F E D R K F A D I G N T V K
 L Q Y S A G V Y R I A E **K A** ~ **S G** W A D I T N A H G V V G P G I V S G L
 K Q A A E E V T K E P R G L L M L A E L S C K G S L S T G E Y T K G T V D
 I A K S D K D F V I G F I A Q R D M G G R D E G Y D W L I M T P G V G L D
 D K G D A L G Q Q Y R T V D D V V S T G S D I I I V G R G L F A K G R D A
 K V E G E R Y R K A G W E A Y L R R C G Q Q N *

^a **FastaSeqBox 5:** Sequência de aminoácidos codificados pelo Controle 2 (CO2).

- iii. Controle 3 (CO3) contendo o gene *URA3* nativo, com 6×*his-tag*, sem o *intein*, substituição G → A (Glicina para Alanina) e inserção de uma G (Glicina) no sítio KGSLSTGE, anteriormente explicada (indicado no FastaSeqBox 6).

>CO3^a

M G S H H H H H H H MSKATYKERAATHPSPVAAKLFNIMHE
 KQTNLCASLDVRTTKELLELVEALGPKICLLKTHVDIL
 TDFSMEGTVKPLKALS AKYNFLLFEDRKFADIGNTVK
 LQYSAGVYRIAEWADITNAHG VVGPGIVSGLKQAAEE
 VTKEPRGLLMLAELSCK **A** ~ **S G** LSTGEYTKGTVDIAK
 SDKDFVIGFIAQRDMGGRDEGYDWLIMTPGVGLDDKG
 DALGQQYRTVDDVVSTGSDIIIVGRGLFAKGRDAKVE
 GERYRKAGWEAYLRRCGQQN*

^a **FastaSeqBox 6:** Sequência de aminoácidos codificados pelo Controle 3 (CO3).

- iv. Um outro importante controle é o controle do não-*splicing* (CT2Mut1). Para inviabilizar que o *intein* sofra *splicing*, os resíduos de aminoácidos essenciais para o ataque nucleofílico para o *splicing* foram substituídos: tanto a Cisteína (C) quanto a Asparagina (N) foram substituídas por Alanina (A) (indicado no FastaSeqBox 7).

>CT2Mut1^a

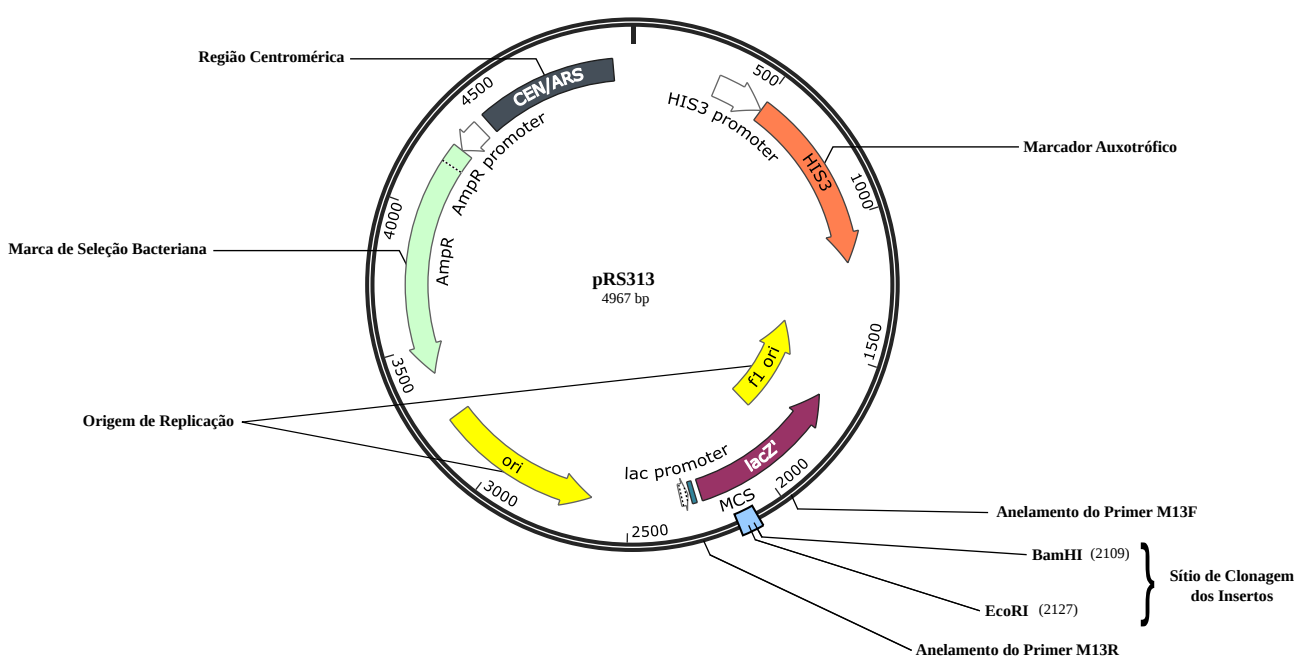
M G S H H H H H H H MSKATYKERAATHPSPVAAKLFNIMHE
 KQTNLCASLDVRTTKELLELVEALGPKICLLKTHVDIL
 TDFSMEGTVKPLKALS AKYNFLLFEDRKFADIGNTVK
 LQYSAGVYRIAEWADITNAHG VVGPGIVSGLKQAAEE
 VTKEPRGLLMLAELSCK **A A** LQNGTRLLRADGSEVLV
 EDVQEGDQLLGPDGTSRTASKIVRGEERLYRIKTHEGL
 EDLVCTHNHILSMYKERSGSERAHSPSADLSLTDHER
 VDVTVDDDFVRLPQQEQQKYQLFRSTASVRHERPFTSK
 LDTTLLRINSIELEDEPTKWSGFVVDKDSLRLRHDYLV
 LHN **S G** LSTGEYTKGTVDIAKSDKDFVIGFIAQRDMGG
 RDEGYDWLIMTPGVGLDDKGDALGQQYRTVDDVVST
 GSDIIIVGRGLFAKGRDAKVEGERYRKAGWEAYLRRC
 GQQN*

^a **FastaSeqBox 7:** Sequência de aminoácidos codificadas pela construção para o controle negativo do *splicing* com mutação nos dois resíduos de aminoácidos essenciais para o *splicing* (CT2Mut1).

3.3 Subclonagens e Verificação das Construções

As construções encomendadas, recebidas no plasmídeo pUC57, foram subclonadas no plasmídeo pRS313 (ATCC #77142), um vetor centromérico com *HIS3* como marca auxotrófica (para seleção em *S. cerevisiae*) e ampR (para seleção em *Escherichia coli*, além de possuir ARS (autonomous replication sequence) e uma região centromérica que o faz se comportar como um cromossomo em leveduras (Figura 8).

Figura 8 – Visão global do plasmídeo pRS313.



Fonte: autoria própria, mas com base em modelos da [SnapGene](#) e da [AddGene](#).

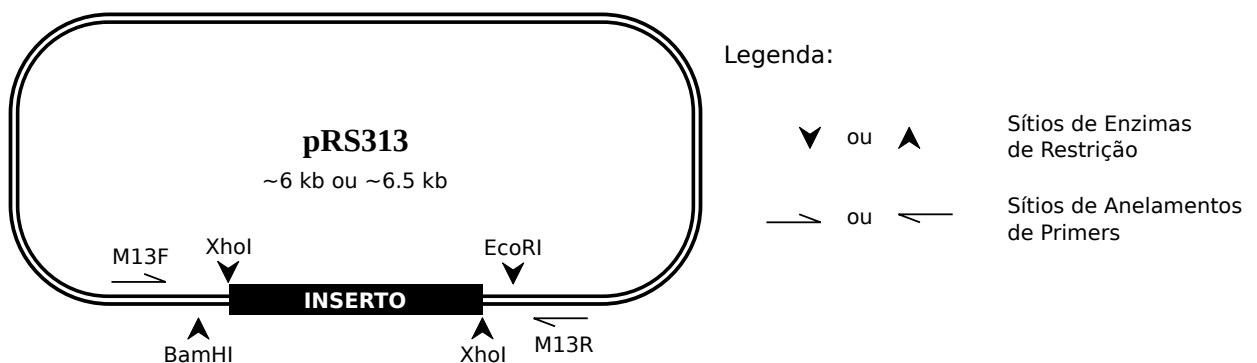
Enfoque no sítio de poli-clonagem (MCS), onde os insetos serão clonados; além da região de anelamento dos *primers* M13.

As construções foram subclonadas do plasmídeo pUC57 para o pRS313 utilizando as endonucleases BamHI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) e EcoRI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) segundo recomendações do fabricante. A ligação foi realizada com a T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) a 16 °C *overnight*, conforme recomendações do fabricante. Com o produto de ligação, células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas e semeadas em meio Luria Bertani (BD Difco™) com ampicilina (100 μ g/mL) (Sigma-Aldrich™). As colônias

transformantes tiveram a presença do inserto verificada por diferentes formas:

- Por PCR direto de colônia com os *primers* M13F (5' - GTAAAACGACGGCCAGT - 3') e M13R (5' - AACAGCTATGACCATG - 3') que se anelam à porção inicial e final do sítio de poli-clonagem do plasmídeo pRS313, respectivamente (Figura 8 e Figura 9);
- Por digestão do plasmídeo extraído (miniprep com kit CloneJet miniprep - Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) com a endonuclease XhoI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), a qual tem sítio de corte que flanqueia as construções sintetizadas pela Genscript (Figura 8 e Figura 9);
- Alternativamente, confirmou-se por reação de PCR com os *primers* P35 (5'- CGC GGA TCC GCT TTT CAA TTC AAT TCA TC-3') e P102 (5' - CGC AAG CTT TTA GTT TTG CTG GCC GCA TCT TC - 3') que se anelam à porção do promotor e na porção final de *URA3*, respectivamente (Figura 6);
- Sequenciamento de DNA com os *primers* M13F (5' - GTA AAA CGA CGG CCA GT - 3') e M13R (5' - AAC AGC TAT GAC CAT G - 3') que se anelam à porção inicial e final do sítio de poli-clonagem do plasmídeo pRS313, respectivamente (Figura 8 e Figura 9).

Figura 9 – Esquema para confirmação da correta ligação no pRS313.



Fonte: autoria própria.

Esquema, no plasmídeo pRS313, das regiões de reconhecimento de enzimas de restrição para clonagem e confirmação de ligação, além das regiões de anelamento dos *primers* M13

Todas as construções foram analisadas por sequenciamento em eletroforese capilar usando o sequenciador ABI3500 (Applied Biosystems), junto Laboratório de Diagnóstico Molecular do departamento de Microbiologia e Imunologia do IBB-UNESP (Botucatu, SP, Brasil). Apenas as amostras cujas sequências apresentaram qualidade ótima no eletroferograma e 100% de identidade com as sequências de nucleotídeo desenhadas para cada construção foram usadas para transformação de leveduras.

3.4 Construção do Plasmídeo pRCT2Mut1

Esta construção corresponde ao controle negativo referente à construção CT2. Para tal utilizou-se a técnica de mutação sítio dirigida por PCR reverso para efetuar a troca de um dos dois aminoácidos essenciais para o *splicing* do *intein*. Escolheu-se a Cisteína (C) para ser substituída por Alanina (A), (conforme indicado no FastaSeqBox 8 e 9, respectivamente).

>CT2Mut1^a

```

M G S H H H H H H M S K A T Y K E R A A T H P S P V A A K L F N I M H E
K Q T N L C A S L D V R T T K E L L E L V E A L G P K I C L L K T H V D I L
T D F S M E G T V K P L K A L S A K Y N F L L F E D R K F A D I G N T V K
L Q Y S A G V Y R I A E W A D I T N A H G V V G P G I V S G L K Q A A E E
V T K E P R G L L M L A E L S C K A A L Q N G T R L L R A D G S E V L V
E D V Q E G D Q L L G P D G T S R T A S K I V R G E E R L Y R I K T H E G L
E D L V C T H N H I L S M Y K E R S G S E R A H S P S A D L S L T D S H E R
V D V T V D D F V R L P Q Q E Q Q K Y Q L F R S T A S V R H E R P F T S K
L D T T L L R I N S I E L E D E P T K W S G F V V D K D S L Y L R H D Y L V
L H N S G L S T G E Y T K G T V D I A K S D K D F V I G F I A Q R D M G G
R D E G Y D W L I M T P G V G L D D K G D A L G Q Q Y R T V D D V V S T
G S D I I V G R G L F A K G R D A K V E G E R Y R K A G W E A Y L R R C
G Q Q N *

```

^a **FastaSeqBox 8:** Sequência de aminoácidos codificadas pela construção de transição para gerar o controle negativo do *splicing*. Enfoque na mutação sítio dirigida do resíduo de aminoácido “C” (cisteína) que é essencial para o *splicing* (CT2Mut1).

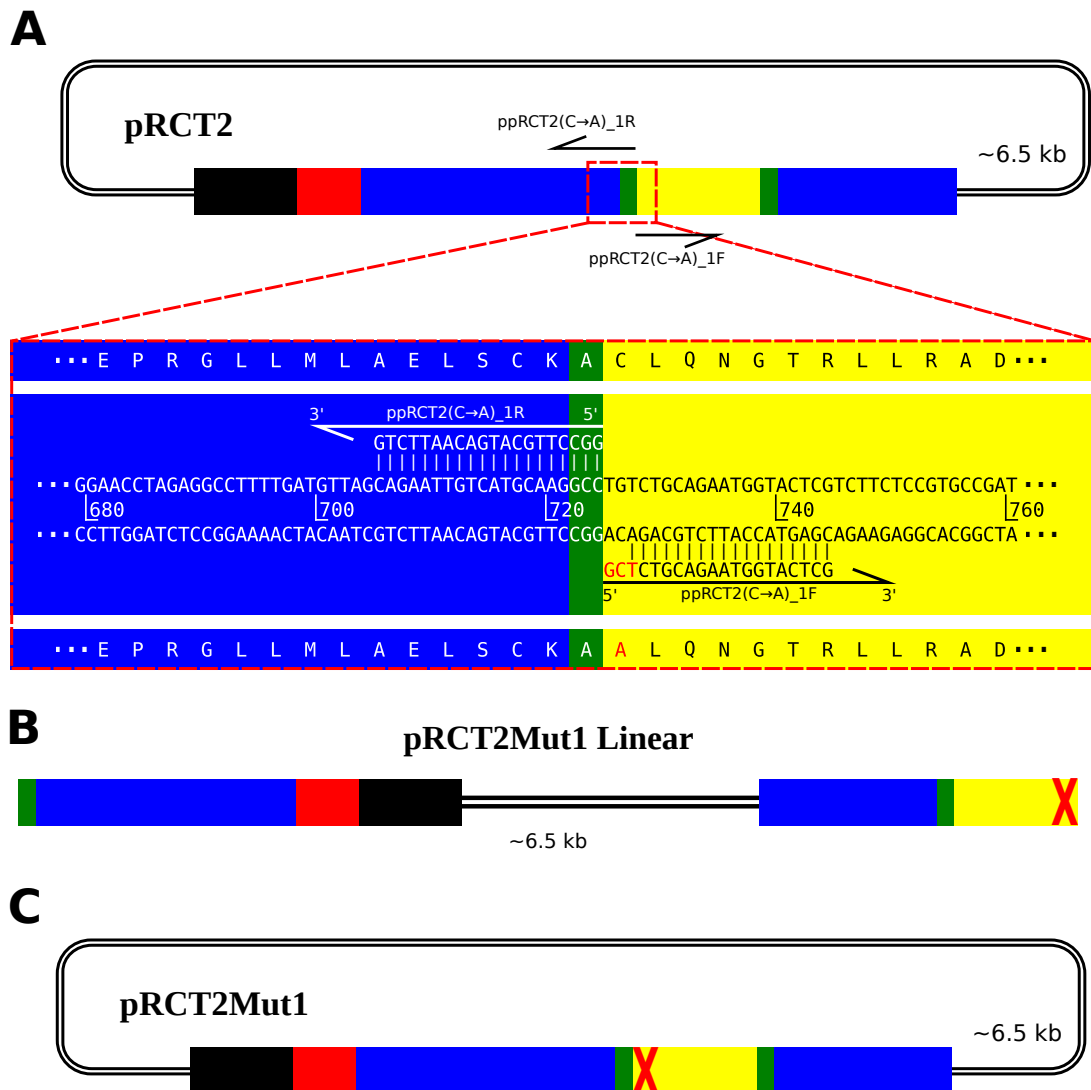
Para isto, dois *primers* foram desenhados e comprados com prévia fosforilação na porção 5’: ppRCT2(C→A)_1F (5’ - GCTCTGCAGAATGGTACTCG - 3’) e ppRCT2(C→A)_1R (5’ - GGCCTTGCATGACAATTCTG - 3’).

As reações de PCRs foram realizadas nas seguintes condições: utilizou-se a Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) e com volume final de 125 μ L para cada reação, dos quais compostos por: buffer GC a concentração final de 1x; 200 μ M de dNTPs; 1,5 M de Betaína; 1,0 μ M de cada um dos *primers*; 1 unidade da enzima por reação; e 0,2 ng de DNA do plasmídeo; termociclagem usada foi:

desnaturação inicial de 98 °C por 3 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 98 °C por 20 segundos, anelamento dos *primers* por 30 segundos a 65 °C e extensão por um 4 minutos e 20 segundos a 72 °C, para a extensão final, utilizou-se 10 minutos a 72 °C. Por fim, separou-se os *amplicons* em gel de agarose 1 % em TBE 1X (tampão Tris - Ácido Bórico - EDTA), utilizou-se o marcador de tamanho molecular 1 Kb DNA Ladder RTU (GeneDireX, Inc., Keelung City, Taiwan). Após a separação das bandas no gel, cortou-se a banda de interesse e o DNA foi extraído com o kit ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA), quantificou-se no gel e no NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). O DNA linear obtido por esta PCR foi ligado com T4 DNA ligase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). O DNA circular resultante desta ligação foi usado para transformar *E. coli* DH10B por eletroporação. Para o primeiro par de *primers*, o DNA molde utilizado foi o DNA plasmidial obtido do pRCT2 (a sequência proteína traduzida é representada no FastaSeqBox 3); e para a segunda reação o DNA molde utilizado foi o pRCT2Mut1 que foi obtido após a primeira mutação sítio dirigida (a sequência proteína traduzida é representada no FastaSeqBox 8). Após o estabelecimento das duas mutações, gerou-se, então, o plasmídeo CT2Mut1 (a sequência proteína traduzida é representada no FastaSeqBox 7 e FastaSeqBox 9).

Como anteriormente explicado, o mecanismo central de funcionamento da mutação sítio dirigida por PCR inverso é a adição da mutação na porção 5' de um dos *primers*, sempre preservado o quadro de leitura. Nas figuras abaixo ([Figura 10](#) e [Figura 11](#)), detalha-se melhor o funcionamento geral de cada uma das reações utilizadas neste trabalho. A ligação foi confirmada com os primers Mut1F (AGAATTGTCATGCAAGGCCGC) e Mut2R (CCAGTAGATAGGCCGGAAGC) e por sequenciamento com os primers M13.

Figura 10 – Esquema detalhado utilizado para inserção da primeira mutação sítio dirigida por PCR inverso.

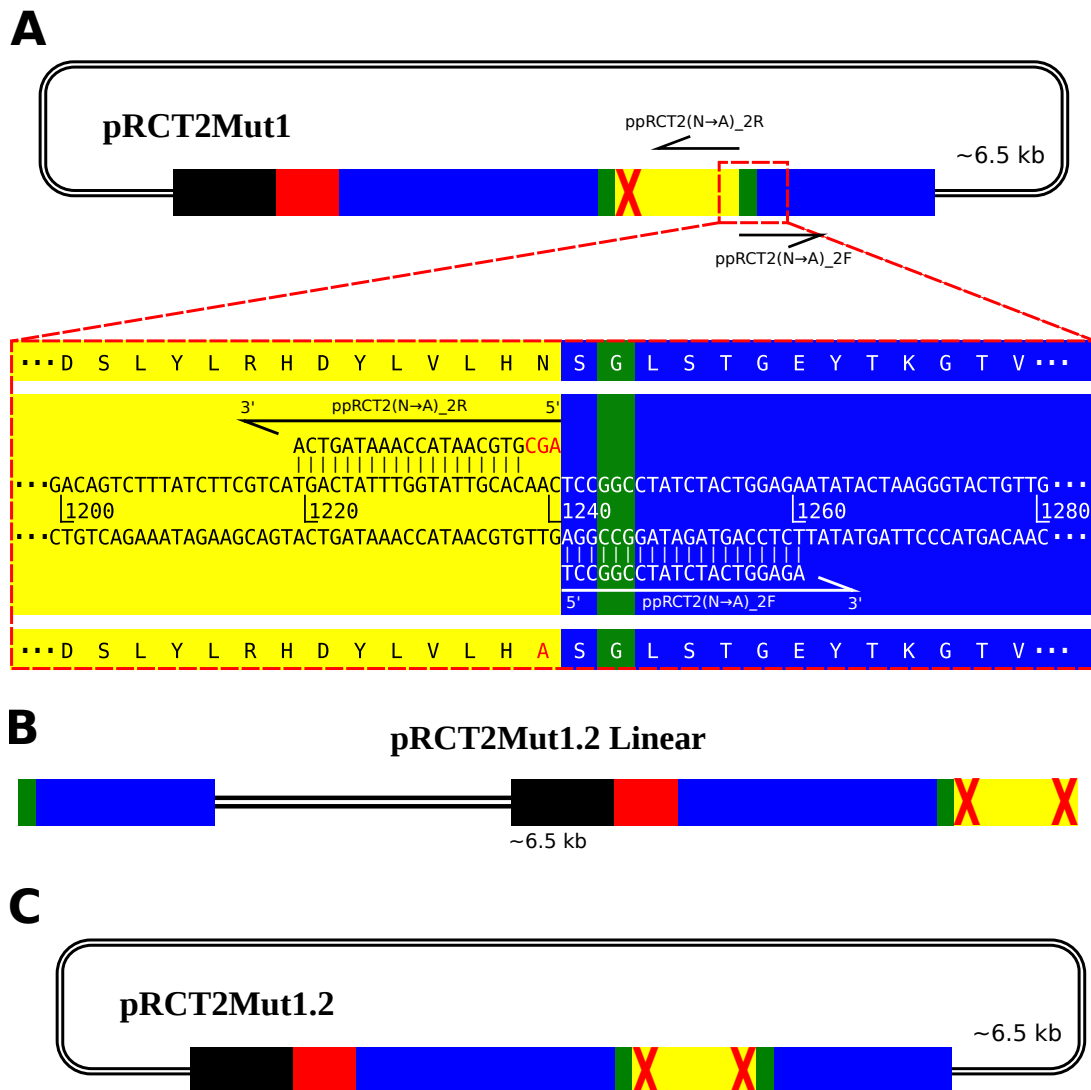


Fonte: autoria própria.

(a) Utilizando o plasmídeo pRCT2 como molde, amplificou-se todo o plasmídeo (aproximadamente 6,5 kb) utilizando os *primers* ppRCT2(C→A)_1F e ppRCT2(C→A)_1R, inserindo assim a primeira mutação os todos os plasmídeos lineares obtidos a partir desta reação. (b) Após a obtenção dos plasmídeos lineares com a mutação do códon TGT → GCT (equivalente ao aminoácido C → A), (c) realizou-se a sua circularização, seguida por posterior transformação e *screening* de plasmídeo adequado.

O padrão de cores do inserto obedece o mesmo padrão de legenda utilizado nas figuras anteriores (vide Figura 6, Página 40). Em fonte vermelha está a inserção da mutação tanto a nível de códon quanto a nível de aminoácido, representado também pela letra X em igual cor de fonte.

Figura 11 – Esquema detalhado utilizado para inserção da segunda mutação sítio dirigida por PCR inverso.



Fonte: autoria própria.

(a) Utilizando o pRCT2Mut1 (gerado anteriormente e melhor detalhado na Figura 10) como molde, amplificou-se todo o plasmídeo (aproximadamente 6,5 kb) utilizando os *primers* ppRCT2(C→A)_1F e ppRCT2(C→A)_1R, inserindo assim a primeira mutação os todos os plasmídeos lineares obtidos a partir desta reação. (b) Após a obtenção dos plasmídeos lineares com a mutação do códon AAC → GCT (N → A), (c) realizou-se a sua circularização, seguida por posterior transformação e *screening* de plasmídeo adequado.

O padrão de cores do inserto obedece o mesmo padrão de legenda utilizado nas figuras anteriores (vide Figura 6, Página 40). Em fonte vermelha está a inserção da mutação tanto a nível de códon quanto a nível de aminoácido, representado também pela letra X em igual cor de fonte.

3.5 Meios de Cultura para *S. cerevisiae*

Neste trabalho foram utilizados quatro diferentes meios de cultura para *S. cerevisiae*, sendo eles:

- YPD (Yeast Extract - Peptone - Dextrose): 0,5 % de extrato de levedura, 1 % de peptona e 2 % de Glicose. Sendo este um meio rico e não-seletivo.

- SC -His (Syntetic Complete sem Histidina): 6,70 g/L de Yeast Nitrogen Base (Difco Inc., Franklin Lakes, NJ, USA); 0,67 g/L de DropOut Mix sem histidina (Clontech, Mountain View, CA, USA); 2 % de Glicose; e, apenas para meio sólido, 20 g/L de Ágar. Neste trabalho, este meio é tratado como meio de seleção, uma vez que apenas leveduras que receberam o plasmídeo pRS313 e estão expressando com sucesso a proteína His3 (marca de seleção do plasmídeo) são capazes de crescer neste meio.

- SC -His -Ura (Syntetic Complete sem Histidina e Uracila): 6,70 g/L de Yeast Nitrogen Base; 0,66 g/L de DropOut Mix sem histidina e uracila (Clontech, Mountain View, CA, USA); 2 % de Glicose; e, apenas para meio sólido, 20 g/L de Ágar. Neste trabalho, este meio é tratado como meio de seletivo e diferencial por seleção positiva, uma vez que apenas leveduras que receberam o plasmídeo, estão expressando com sucesso a proteína His3 e estão expressando a proteína Ura3 funcional são capazes de crescer neste meio.

- 5-FoA (SC -His -Ura acrescido de Uracil e de Ácido 5-Fluorótico): 6,70g/L de Yeast Nitrogen Base; 0,66g/L de DropOut Mix sem histidina e uracila; 2 % de Glicose; 20g/L de Ágar; 50mg/L de Uracil (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, MO, USA); e 1g/L de 5-FoA (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, MO, USA). Neste trabalho, este meio é tratado como meio seletivo e diferencial por seleção negativa, uma vez que apenas leveduras que receberam o plasmídeo, estão expressando com sucesso a proteína His3 e não possuem ou possuem de forma não funcional a proteína Ura3 são capazes de crescer neste meio; ao passo que as que estão expressando a proteína Ura3 funcional

metabolizam o 5-FoA, gerando um antimetabólito capaz de matá-las, e, portanto, não são crescem neste meio.

3.6 Transformação de *S. cerevisiae*

Foram utilizadas as cepas SVL82 (W3O3) de genótipo *MATa* Δ ade2-1 Δ his3-11,15 Δ leu2-3,112 Δ trp1-1 Δ ura3-1 Δ can1-100 Δ ssd1-d e as cepas AD1234567a e a AD123456789a de *S. cerevisiae* para a transformação. As cepas AD possuem deleções múltiplas nos genes *PDR* que codificam transportadores ABC as quais regulam a permeabilidade da membrana plasmática.

Para a transformação das leveduras, utilizou-se o método desenvolvido anteriormente (GIETZ; WOODS, 2002), com algumas modificações a seguir relatadas: um dia antes das transformações, uma colônia fresca (2-3 dias) da levedura crescida em YPD sólido (acrescido de 2 % de Ágar) foi selecionada e incubada a 30 °C em 5 mL de YPD líquido sob agitação de 250 rpm. No dia seguinte, a densidade óptica da cultura, ao comprimento de onda de 600nm, foi aferida a fim de preparar uma nova cultura líquida diluída para uma concentração de 0,2 OD₆₀₀, em volume final de 5 mL de YPD. A cultura diluída foi incubada novamente nas mesmas condições supracitadas. A checagem da OD₆₀₀ foi realizada em intervalos regulares de tempo até esta atingir OD₆₀₀ próxima de 0,8. Neste ponto, as células foram centrifugadas na velocidade máxima por 15 segundos e ressuspendidas em 1 mL de LiOAc 100mM (Acetato de Lítio – Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, MO, USA) e incubadas por 15 minutos a 30 °C sob agitação de 250 rpm e então centrifugadas a 3000 ×G por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado de células, adicionou-se 240 μL de PEG₄₀₀₀ (Polietilenoglicol 4000, 50 % w/v – Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, MO, USA), 36 μL de LiOAc a 1M, 50 μL de SS-DNA (2,0 mg/mL – Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, MO, USA — previamente aquecido a 100 °C por 10 minutos e imediatamente colocado no gelo) e 10 μL do plasmídeo (aproximadamente, 800 ng). Agitou-se em vórtex à velocidade máxima por 1 minuto, incubou-se a 25 °C por 20 minutos e em seguida a 42 °C por 20 minutos. Completado o tempo, centrifugou-se à velocidade máxima por 15 segundos, o sobrenadante foi descartado e as leveduras ressuspendidas em 100 μL de água ultrapura e plaqueadas em placas com o meio SC –His sólido. As placas foram mantidas em BODs a 30 °C por até 4 dias ou até que colônias transformantes pudessem ser observadas (não excedendo 7 dias). Por fim, 4

colônias distintas foram selecionadas de cada uma das placas. Tal protocolo foi repetido para cada uma das seis construções (os testes: pRCT1 e pRCT2; e os controles: pRCO1, pRCO2, pRCO3 e pRCT2Mut1) e para o plasmídeo pRS313-Ø.

3.7 Avaliação da Função *splicing* do *Intein CnePrp8* e da Funcionalidade da Proteína Ura3

3.7.1 Teste de Crescimento e Sensibilidade à Temperatura

Quatro colônias transformantes com cada um dos plasmídeos foram utilizadas para teste de crescimento nos meios SC –His, SC –His –Ura e 5-FoA. Para a realização do teste de crescimento, as leveduras transformantes foram cultivadas em 5 mL de SC-His até atingirem a OD₆₀₀ próxima de 0,8 (aproximadamente 2×10^7 células/mL). As culturas foram centrifugadas a velocidade máxima por trinta segundos e as células precipitadas foram ressuspensas em solução de NaCl a 0,85 % para uma concentração 10 vezes maior que a inicial (2×10^8 células/mL). Cem microlitros da suspensão de células foram transferidas para o primeiro poço de uma microplaca estéril de 96 poços. Noventa microlitros de solução de NaCl 0,85 % foi adicionada aos cinco poços seguintes e cinco diluições seriadas de 1:10 foram realizadas. Para tal transferiu-se 10 μ L do primeiro poço para o segundo e assim sucessivamente. Com um micropipetador multicanal, 10 μ L de cada diluição foram semeadas nos três diferentes meios: SC –His, SC –His –Ura e 5-FoA e incubados a 25 °C e a 37 °C por 4 dias. Ao término do último dia, as placas foram fotodocumentadas.

3.7.2 Influência da Cisplatina no *splicing* do *Intein* CnePrp8 em Ura3

Sabe-se que alguns compostos de platina, em especial a Cisplatina – um análogo de platina amplamente utilizado no tratamento quimioterápico de pacientes com câncer – inibe o *splicing* do *intein* RecA de *Mycobacterium tuberculosis*, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (CHAN et al., 2016); e sugeriu-se o *intein* RecA de espécies de *Mycobacterium* como um novo alvo terapêutico (ZHANG et al., 2011).

Para determinar se, no sistema aqui apresentado, a Cisplatina atua de modo a inibir o *splicing* do *intein* CnePrp8 em Ura3, realizou-se um ensaio de microdiluição em placas de 96 poços. Fez-se 12 diferentes diluições seriadas da droga, de modo que todas as amostras foram cultivadas em concentrações de Cisplatina variando de 4216,53 μM até 4,12 μM – decidiu-se utilizar tal intervalo de concentrações, pois elas são, respectivamente, a concentração máxima possível de Cisplatina em meio aquoso e a concentração sérica mínima mantida em humanos após tratamento com a Cisplatina. Seguiu-se as recomendações do protocolo ‘Antifungal MIC method for yeasts’, da EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), versão EDef 7.3 revisada e atualizada em Dezembro de 2015 (EUCAST - EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 2015; RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2008). No entanto, algumas alterações se fizeram necessárias: os meios de cultivo foram substituídos pelo SC –His; SC –His –Ura e 5-FoA; os controles negativos foram realocados para a última linha de poços da placa; e utilizou-se controles negativos de inóculo para cada uma das concentração testadas da droga; além de fazer a análise em triplicata experimental.

Sabidamente, a Cisplatina é fotossensível, então, durante todo o tempo de manipulação da droga e sempre que possível, os experimentos foram conduzidos no escuro.

Foram realizadas leituras em 24 h, 48 h e 72 h após a incubação em dois diferentes comprimentos de onda: OD₅₃₀ e OD₆₀₀. Cada um dos poços teve a leitura óptica diminuída de seu respectivo branco. Para fins de normalização do crescimento, o crescimento de cada uma das amostras no poço sem droga foi tida como crescimento 100 % e das demais foram normalizadas por este.

3.8 Análise da Expressão Gênica

3.8.1 Análise da transcrição do RNA Mensageiro (Transcrição Reversa e PCR)

Para avaliar a transcrição das construções, as leveduras transformadas e leveduras não transformadas foram crescidas em 30 mL de meio líquido apropriado (ou seja, para as construções que estão com a produção da proteína Ura3 funcional confirmada pelo teste de sensibilidade à temperatura e em meios distintos utilizou-se o meio SC –His –Ura; para as que não estavam produzindo a proteína Ura3 funcional ou não a produzia normalmente utilizou-se o meio SC –His; e para a levedura sem o plasmídeo, utilizou-se YPD), sob agitação de 250 rpm até que a OD₆₀₀ de entre 0,8 e 1,0 fosse atingida. Então, as células foram centrifugadas em velocidade máxima por 30 segundos, o sobrenadante descartado e as células lavadas duas vezes em água ultrapura. O precipitado de células, foi macerado em nitrogênio líquido utilizando-se cadinho e pistilo esterilizados por calor seco e o macerado foi recuperado com 3 mL de TRIzol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Adicionou-se 600 μ L de clorofórmio e centrifugou-se por 15 minutos a 12.000 g. Dois terços da fase incolor que contém moléculas de RNA foi recuperado e passado em coluna de sílica com afinidade por ácidos nucleicos. Depois dessa etapa, utilizou-se o kit PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), conforme recomendações do fabricante. Para eliminar qualquer contaminação por DNA, utilizou-se a enzima PureLink® DNase (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) conforme recomendações do fabricante. Ao final, para determinar a pureza do RNA extraído, utilizou-se o NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Tal processo foi repetido para todas as amostras.

Para a síntese da fita complementar (cDNA) aos RNAs mensageiros extraídos das amostras, utilizou-se o kit RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA), usando *primers* oligo(dT)₁₈ e as demais etapas foram seguidas conforme recomendações do fabricante.

Este cDNA foi amplificado por PCR usando os *primers* p3s (5' - ATG TCG AAA GCT ACA TAT AAG G - 3') e p102s (5' - TTA GTT TTG CTG GCC GCA TCT TC - 3') que se anelam nas porções do gene *URA3* que codificam as regiões N-terminal e

C-terminal da proteína, respectivamente. Para a reação de amplificação, utilizou-se a Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) e com volume final de 12,5 μL para cada reação, dos quais compostos por: buffer GC a concentração final de 1x; 200 μM de dNTPs; 3 % de DMSO; 1,0 μM de cada um dos *primers*; 0,25 unidades da enzima por reação; e 0,2 μL do cDNA. A termociclagem usada foi: desnaturação inicial de 98 °C por 2 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 98 °C por 45 segundos, anelamento dos *primers* por 1 minuto a 61,6 °C e extensão por um 1 minuto e 30 segundos a 72 °C; para extensão final, utilizou-se 10 minutos a 72 °C. Por fim, separou-se os *amplicons* em gel de agarose 1 % diluído em TAE 1X (tampão Tris-Acetato-EDTA) usando o marcador de tamanho molecular Ladder 1 kb (Ludwig Biotecnologia LTDA, Alvorada, RS, Brasil).

Adicionalmente, desenhou-se os *primers* pCnePrp8-Intein_F (5'- TGT CTG CAG AAT GGT ACT CG - 3') e pCnePrp8-Intein_R (5' - CAA TAC CAA ATA GTC ATG ACG - 3') que amplificam apenas o *intein* Prp8 aqui inserido na proteína Ura3. A reação de amplificação deu-se do mesmo modo supracitado, alterando apenas a temperatura de anelamento para 58 °C.

3.8.2 Análise da Proteína Ura3 Expressa (Extração Proteica e Detecção Proteica)

Para detectar a proteína Ura3 nos diferentes transformantes, exemplares dos mesmos transformantes utilizados em testes anteriores foram inoculados em 6 mL de meio líquido apropriado (ou seja, para as construções que produzem a proteína Ura3 funcional, utilizou-se o meio SC –His –Ura; para as que não produzem a proteína Ura3 funcional ou não a produzia normalmente utilizou-se o meio SC –His; e para as leveduras sem o plasmídeo, utilizou-se YPD) até a OD₆₀₀ de entre 0,8 e 1,0, sempre a 28 °C. O crescimento foi monitorado em intervalos regulares de tempo até que a OD₆₀₀ esperada fosse atingida. Então, as células foram centrifugadas em velocidade máxima por 30 segundos, o sobrenadante descartado e as células lavadas duas vezes em água ultrapura. O precipitado celular foi guardado em freezer -80°C até ser usado.

Para a extração de proteínas totais, dois diferentes métodos foram utilizados: lise mecânica e lise alcalina.

Para a Lise Mecânica, as culturas foram descongeladas e mantidas em gelo. Cento e cinquenta microlitros de Tampão de Lise [50 mM de TE pH7,5; 1 mM de DTT-Dithiotreitol; inibidor de protease PLAC 1X (5 mg/mL de cada um dos componentes: antipaína, pepstatina, quimostatina, aprotinina, leupeptina) e 100 mM de KCl], junto a igual volume de pérolas de vidro entre 425 μ M e 600 μ M de diâmetro (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, MO, USA) foram adicionados às células precipitadas. A mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos, sete vezes consecutivas, com intervalos de 1 minuto, e centrifugadas a 14000 rpm por 25 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e crio-preservado em freezer a -80°C até ser utilizado (VISWESWARAIAH; DAUTEL; SATTLEGER, 2011).

Para a Lise Alcalina, as culturas foram descongeladas e mantidas em gelo. Ressuspendeu-se em 200 μ L da Solução de Lise (NaOH 1,85 M e 7,4 % de β -Mercaptoetanol) e incubou-se por cerca de 15 min em gelo. Precipitou-se as proteínas com adição de 200 μ L de Ácido Tricloro Acético 50 % w/w gelado, incubou-se por mais 15 min em gelo, centrifugou-se à 4 °C e velocidade máxima por 10 min. O sobrenadante foi descartado, o precipitado

lavado duas vezes com 1 mL de Acetona gelada, e ressuspendido em 200 μL de Tampão de Eluição (Ureia 8M, Fosfato monossódico 100mM e Tris 50mM) (PINDER; MCQUAID; DOBSON, 2013).

Para a quantificação das proteínas extraídas, os extratos proteicos totais de cada uma das amostras foram diluídos em 1:50 e então quantificados no espectrômetro Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA), utilizando-se o seu acessório Take3 Micro-Volume Plates (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) e instruções do fabricante. Adicionalmente, as amostras também foram quantificadas pelo método de Bradford, conforme descrito anteriormente (BRADFORD, 1976), utilizando-se como padrão as seguintes concentrações de Albumina Sérica Bovina (BSA): 4,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,0625 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). As amostras proteicas foram diluídas para 1:25. Utilizou-se, sempre, 250 μL do reagente de Bradford pronto para uso e 2,5 μL da amostra proteica. Todas as quantificações foram feitas em triplicata. Obteve-se as médias de todas as amostras, fez-se a curva padrão com as amostras de concentração conhecida, obteve-se a função do gráfico e, por fim, estimou-se a concentração dos extratos proteicos.

Para análise das proteínas por SDS-PAGE (Eletroforese em gel de Poliacrilamida), as amostras foram diluídas em um volume final de 100 μL contendo 50 μL de Tampão de Amostra 2X (100mM de TrisHCl, pH 6,8; 4 % de SDS; 0,2 % de Azul de Bromofenol, 20 % de glicerol e DTT 200mM) ou Tampão de Carregamento de Amostra 2x (Tris 125 mM, pH 6,8; 4 % de SDS; 20 % Glicerol; 4 % de β -Mercaptoetanol; Ureia 1M; 0,05 % de Azul de Bromofenol; 0,05 % de Xileno Cianol) e 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (concentração final) de extrato protéico de interesse. Trinta microlitros desta mistura foram aplicados em gel de poliacrilamida a 12 %, com stacking gel à 5 %, e marcador de peso molecular PageRuler pré-corado (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). A corrida foi realizada a 50 V até o tampão de amostra sair da primeira fase do gel e entrar na segunda; neste momento voltagem foi aumentada para 120 V e a corrida mantida por mais 90 minutos.

Para a coloração com Coomassie Brilliant Blue G-250, o gel de poliacrilamida, com as proteínas já separadas foi lavado em água MilliQ para que a maior parte do SDS

fosse removida. Na sequência, adicionou-se solução de Azul de Coomassie Brilhante G-250 Coloidal (0.1 % Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 % de Metanol e 10 % Ácido Acético Glacial) até cobrir o gel. Incubou-se sob constante agitação à temperatura ambiente por 5 horas e realizou-se o processo de descoloração com solução de descorante (40 % Metanol e 10 % Ácido Acético Glacial).

Para a detecção de proteína Ura3 pela 6×*his-tag* adicionada, utilizou-se dois diferentes métodos: coloração pelo corante *InVision* (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) e por *Western Blot*.

Para a detecção das proteínas de interesse pelo *InVision*, após a separação das proteínas presentes no extrato total conforme aqui já descrito, o gel foi lavado com água MilliQ, as proteínas foram fixadas por 2 horas em Solução Fixadora (40 % Metanol e 10 % Ácido Acético Glacial); e em seguida submergiu-se o gel em 10mL do corante *InVision*, que tem como principal composto o cobalto, que sabidamente tem forte afinidade por oligo-histidinas, associado à um fluoróforo, durante os seguintes intervalos de tempo: 45 minutos (gel 1), 2 horas (gel 2), 16 horas (gel 3) e 72 horas (gel 4). Após a coloração com o *InVision*, os géis foram lavados com o Tampão de Fosfato (20 mM de Fosfato de Sódio monobásico e pH ajustado para 7,8) por três vezes de 20 minutos/cada. Por fim, e sempre preservando os géis da luz, colocou-se sobre luz UV ao comprimento de onda de 560nm. As imagens foram salvas no sistema BioRad ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canadá) com posterior tratamento e análise.

Para o *Western Blot*, as bandas do gel SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose a 100 V por 2 h. A membrana foi tratada com o anticorpo anti-6×*his-tag* (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) para evidenciar a presença da proteína Ura3 que está com *tag* de hexa-histidina. A membrana foi bloqueada com leite desnatado a 10 % em PBST (PBS adicionado de 0,05 % de Tween 20) por 30 minutos e depois incubada com 3 mL de PBST contendo anticorpo primário (anti-6×*his-tag* de camundongo no título de 1:10.000) por 2 h. Então, a membrana foi lavada três vezes em PBST por 5 minutos cada e incubada por 1 h com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase no título de 1:10.000 em PBST. O passo de lavagem

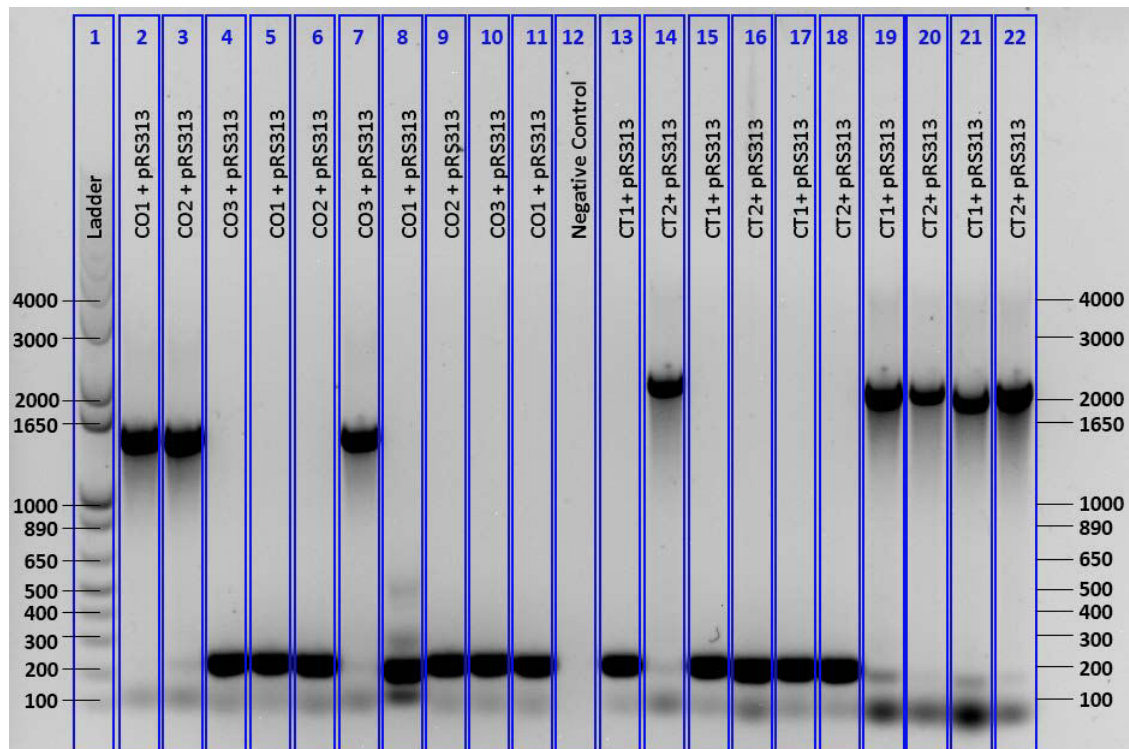
foi repetido e as membranas tratadas com o reagente quimioluminescente de revelação (5 mL de ECL – enhanced luminol-based chemiluminescent substrate – mais 1,5 μ L de H₂O₂ a 30 %). A membrana foi exposta ao fotodocumentador ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canadá) com sistema de filtros e câmeras especiais para fotodocumentação de *Western Blot*. Como controle positivo, utilizou-se ou a proteína DHPS (Deoxyhypusine synthase) com cerca de 50 kDa ou a proteína ExoMeg1 de aproximadamente 37 kDa, sendo ambas fusionadas com 6 \times *his-tag*. Para as construções que não possuem o *intein* CnePrp8 ou onde o *splicing* é efetivo, espera-se evidenciar uma banda de 30 kDa; caso o *intein* CnePrp8 não sofra *splicing* uma banda de 50 kDa será evidenciada. Como controle de carregamento de amostra, utilizou-se detecção da proteína *housekeeping* eiF5a (17 kDa) pelo com o anticorpo anti-eiF5a.

A semiquantificação relativa das bandas do *Western Blot* foi feita através do programa ImageJ 1.52a (versão para Linux do NIH Image, <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) e de protocolos previamente estabelecidos (GASSMANN et al., 2009; HEIDEBRECHT et al., 2009). A fim de comparação, dados de espectrometria de massas de *S. cerevisiae* obtidos em outros trabalhos (CRAIG et al., 2006; DEUTSCH; LAM; AEBERSOLD, 2008; KING et al., 2006; LU et al., 2007; NAGARAJ et al., 2012; PICOTTI et al., 2013; SERIKAWA et al., 2003) foram acessados através do PaxDB (WANG et al., 2015) e divididos dois grupos: sendo o primeiro com alta disponibilidade de uracila e segundo com baixa disponibilidade de uracila; em seguida procedeu-se com a quantificação de eiF5a, Ura3 e relação Ura3/eiF5a.

4 Resultados

4.1 Subclonagens e Confirmação das Construções

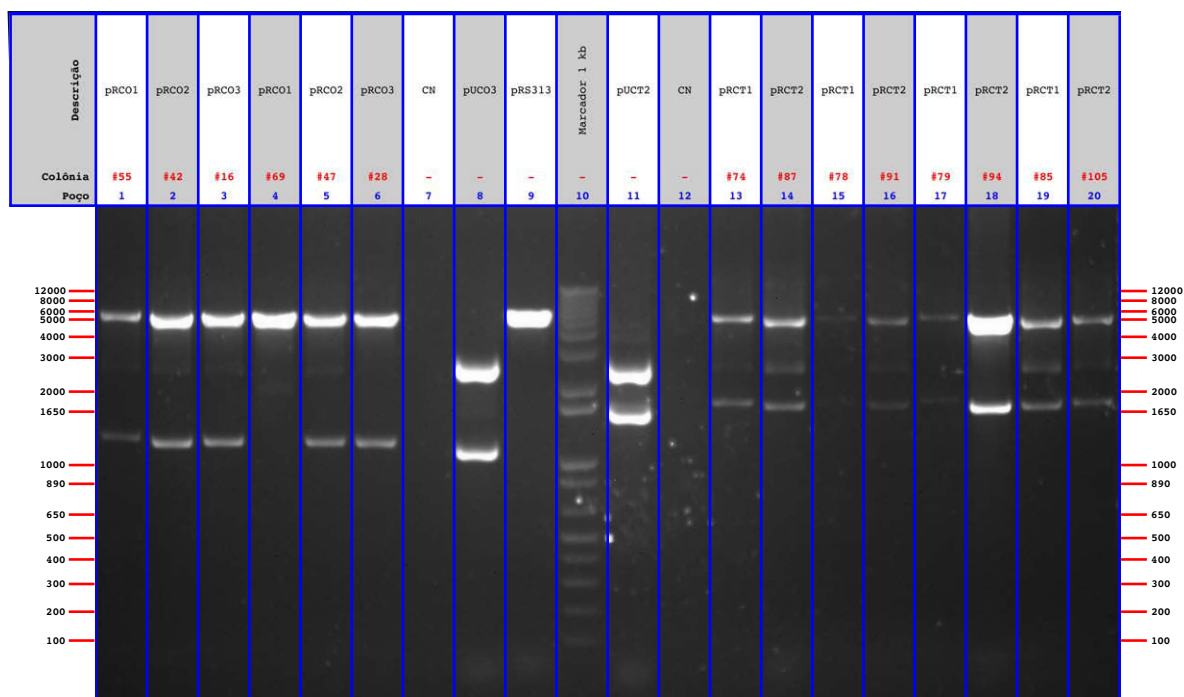
A confirmação do sucesso nas clonagens foi realizada por três diferentes modos: por PCR de colônia bacteriana com *primers* M13 (Promega Corporation, Madison, WI, USA) (Figura 12), digestão dos plasmídeos extraídos com a endonuclease XhoI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) (Figura 13), e sequenciamento e análise dos dados com uso do Software MEGA v6.0.6 (TAMURA et al., 2013), segundo o qual verificou-se que as construções estavam corretas e não existia mutações (substituições ou indels que pudessem inviabilizar os próximos experimentos).

Figura 12 – Análise da subclonagem por PCR de colônias com os *primers* M13.

Fonte: autoria própria.

Análise da subclonagem por PCR de colônias transformantes com os *primers* M13. No poço 1, o marcador molecular; no 12, o controle negativo da reação; do poço 2 ao 11 intercalados, o pRS313 ligado com o CO1, CO2 e CO3, respectivamente; do poço 13 ao 22, intercalados, o pRS313 ligado ao CT1 e CT2, respectivamente. Bandas de aproximadamente 1500pb são esperadas para colônias que estão com o correto inserto de CO1, CO2 ou CO3. Bandas de aproximadamente 2000pb são esperadas para as colônias com correto inserto de CT1 ou CT2. Bandas de aproximadamente 200pb são referentes à amplificação de pRS313- \emptyset , isto é, sem nenhum inserto.

Figura 13 – Resultados dos produtos da reação de digestão plasmidial com XhoI.



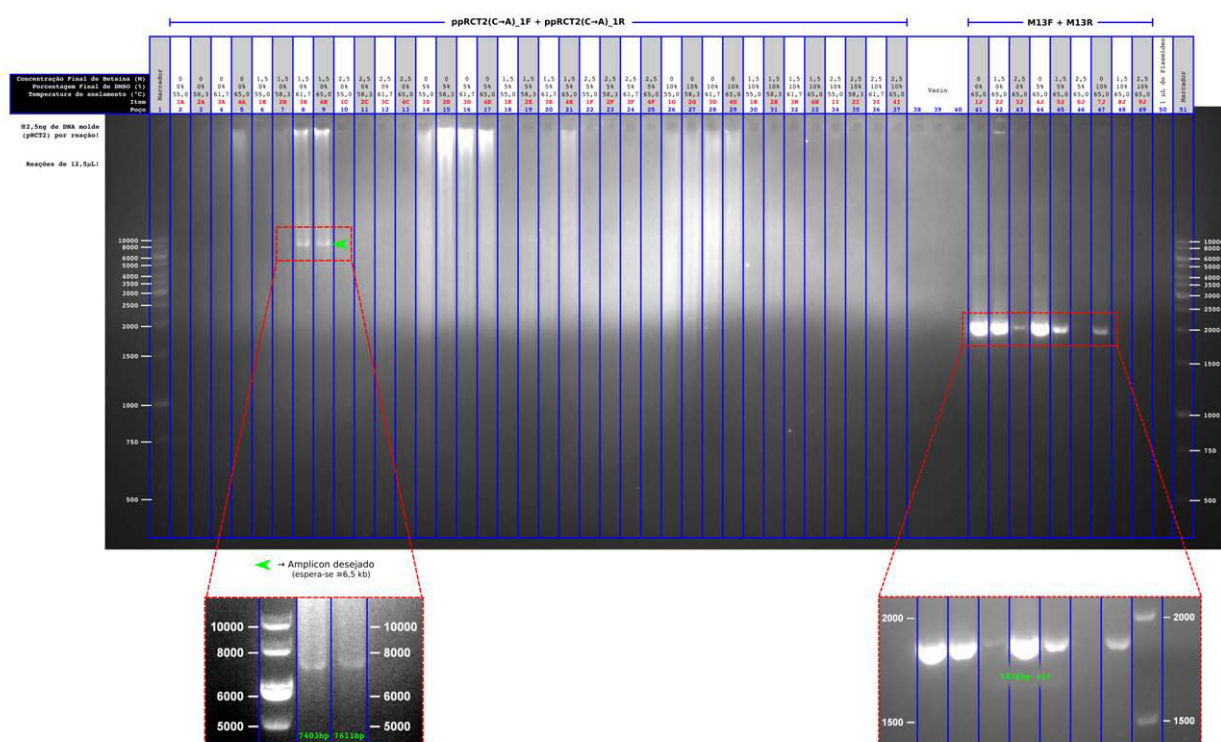
Fonte: autoria própria.

Análise da subclonagem por digestão do plasmídeo com XhoI. Para as colônias que foram positivas por PCR, extraiu-se o DNA plasmidial e em seguida realizou-se digestão desse DNA com a enzima de restrição XhoI. Bandas aproximadamente 5kb são referentes ao pRS313; bandas de aproximadamente 1300pb são esperadas para o CO1, CO2 ou CO3; enquanto bandas de aproximadamente 1500pb são esperadas para o CT1 ou CT2. Nos poços onde apenas bandas de aproximadamente 5kb são observadas sem nenhuma banda adicional, tem-se o plasmídeo pRS313-∅, isto é, sem nenhum inserto. Como controle do tamanho das bandas observados na digestão dos plasmídeos, utilizou-se os plasmídeos também digeridos com XhoI pUCO3 (poço 8), pUCT2 (poço 11) e do pRS313-∅ (poço 9), sendo este o *backbone* da ligação.

4.2 Construção Do Plasmídeo pRCT2Mut1

Devido a dificuldades na padronização dos PCRs necessários para as mutações sítio-dirigidas, testes foram realizados com diferentes concentrações de Betaína e/ou DMSO e diferentes temperaturas de anelamento (Figura 14). Como controle positivo de reação, utilizou-se os *primers* M13, que amplificam o sítio de policlonagem do plasmídeo.

Figura 14 – Padronização da reação de PCR para a primeira mutação sítio dirigida.



Fonte: autoria própria.

Enfoque nos poços com *amplicons*. O marcador de 1 kb foi utilizado nos poços 1 e 51. Para os *amplicons* do poço 2 ao 37 foram usados os *primers* para inserir a primeira mutação sítio dirigida. Testou-se ainda diferentes concentrações de DMSO, betaína e temperatura de anelamento para cada uma das reações. Apenas em duas condições foi possível obter amplificação (poços 8 e 9). Do poço 41 ao 50 estão os amplicons gerados pelos *primers* M13, como controle positivo, para cada uma das condições de DMSO e betaína testadas.

Apenas foi possível observar amplificação adequada em concentração de Betaína a 1,5M e temperatura de anelamento de 61,7 °C ou 65 °C. No entanto, as bandas observadas foram de 7,4 kb para a temperatura de anelamento de 61,7 °C, e de 7,6 kb para a

temperatura de anelamento de 65 °C – cerca de 1kb acima da banda esperada para o plasmídeo total que tem aproximadamente 6,5kb. (Figura 14).

O produto de PCR com volume final de 125 μ L com a temperatura de anelamento de 65 °C foi purificado e quantificado. Apresentou uma concentração de 3,2 ng/ μ L e relação A_{260}/A_{280} de 1,73. A concentração deste produto purificado estimado no gel de agarose foi de 4,3 ng/ μ L. Com este DNA linear, fez-se sua circularização com a T4 DNA ligase, segundo o protocolo já mencionado. O produto de ligação foi utilizado para eletroporar *E. coli* DH10B eletrocompetentes, utilizando os devidos controles negativos. Todas as colônias transformantes tiveram a presença do inserto (incluindo toda a *URA3* e o CnePrp8i – conforme Figura 6, FastaSeqBox 7 e FastaSeqBox 9) e do CnePrp8i verificadas através de PCR de colônia utilizando um PCR multiplex com os *primers* M13F, M13R, CnePrp8_inteinF e CnePrp8_inteinR (Figura 15); os tamanhos dos *amplicons* esperados encontram-se na Tabela 2, onde também mostra-se o par de *primers* capazes de gerar *amplicons*.

Tabela 2 – Tamanhos dos *amplicons* esperados para o inserto e para o *intein* usando a abordagem de PCR Multiplex.

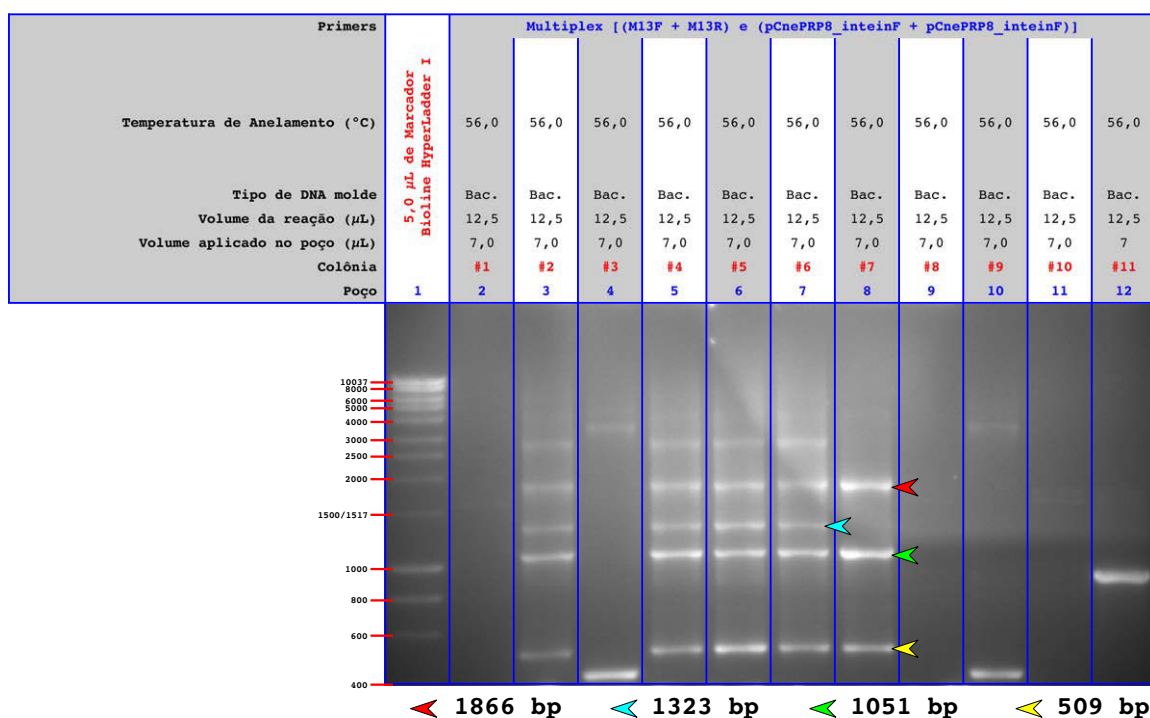
	M13F	M13R	CnePRP8_inteinF	CnePRP8_inteinR
M13F	✗	1866 bp	✗	✓
M13R	✓	✗	1051 bp	✗
CnePRP8_inteinF	✗	✓	✗	509 bp
CnePRP8_inteinR	1323 bp	✗	✓	✗

Fonte: autoria própria.

Nota: O ✗, em vermelho, mostra que não há amplificação para o *set* de *primers* correspondente; já o ✓ e os valores em verde mostram os *sets* de *primers* que amplificam e o tamanho da banda correspondente para o respectivo *set*.

Algumas das colônias não apresentaram as bandas (Figura 15, colônias #1, #8 e #10 – poços 2, 9 e 11, respectivamente); outras não apresentaram bandas esperadas para o PCR multiplex (Figura 15, colônias #3, #10 e #11 – poços 4, 11 e 12, respectivamente); outras não apresentaram todas as bandas esperadas para o PCR multiplex (Figura 15, colônia #7 – poço 8); mas a grande maioria apresentou todas as bandas esperadas para o PCR multiplex (Figura 15, colônias #2, #4, #5 e #6 – poços 3, 5, 6 e 7, respectivamente). Para minimizar a banda inespecífica de 3 kb que aparece neste PCR Multiplex, fez-se a

Figura 15 – Gel de PCR de colônias bacterianas transformantes com o produto de ligação para produção do pRCT2Mut1.



Fonte: autoria própria.

Gel representativo com 11 das 28 colônias resultantes da primeira mutação sítio dirigida. Para identificação correta, os *amplicons* esperados estão com o tamanho marcado com cabeças de setas coloridas com tamanho identificado na própria figura. Para detalhes do par de *primers* que originaram os *amplicons* evidenciados, utilizar a Tabela 2.

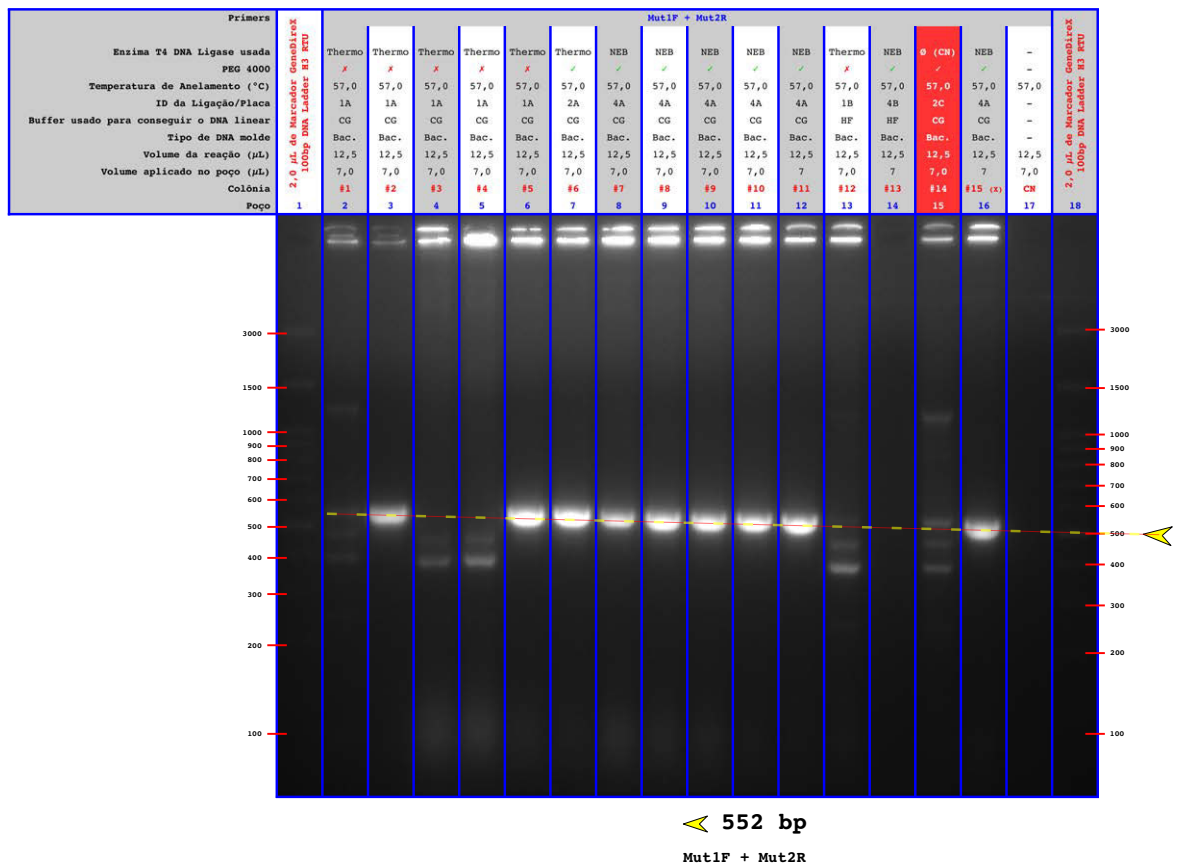
padronização da melhor temperatura de anelamento, mas apenas foi possível minimizá-la (dado não apresentado). Por apresentar bandas específicas mais intensas, a colônia de número #19 foi selecionada para dar continuidade ao trabalho e efetuar a segunda mutação, sendo chamada de pRCT2Mut1 #19, ou apenas pRCT2Mut1.

Todas as colônias transformantes tiveram a presença do inserto e do *intein* verificadas através de PCR de colônia utilizando o PCR multiplex anteriormente demonstrado (??); os tamanhos dos *amplicons* esperados encontram-se na Tabela 2, onde também mostra-se o par de *primers* geradores de *amplicons*.

Para rastrear e descartar os falsos positivos para a inserção da mutação, foram utilizados os *primers* Mut1F e Mut2R, com a porção 3' do *primer* 1 hibridizando exatamente

na mutação, sendo, então, essenciais para identificar quais destas colônias continham o inserto correto. Com o desenho destes *primers*, apenas colônias com a mutação correta seriam amplificadas (Figura 16).

Figura 16 – Gel do PCR de colônias bacterianas transformantes com o produto de ligação para produção do pRCT2Mut1, obtido com os *primers* Mut1F e Mut2R.



Fonte: autoria própria.

Bandas de 552 pb são esperadas para colônias com as corretas inserções das mutações.

Exceto a colônia #13 (Figura 16, poço 14), as demais apresentaram bandas. Algumas das colônias não apresentaram bandas esperadas para este PCR (Figura 16, colônias #1, #3, #4 e #12 – poços 2, 4, 5 e 13, respectivamente); e a grande maioria apresentou a banda esperada para este PCR (Figura 16, colônias #2, #5, #6, #7, #8, #9, #10, #11 e #15 – poços 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 16, respectivamente), evidenciando

assim a inserção das duas mutações. Selecionou-se a colônia #8 para continuar com os demais experimentos.

O resultado do sequenciamento mostrou que o plasmídeo pRCT2Mut1 da colônia #19 estava correto.

4.3 Transformação de *S. cerevisiae*

Não se obteve êxito na transformação das cepas AD1-7 ou AD1-9 com todas as construções desejadas. Por tal motivo, optou-se por continuar apenas com as cepas SVL82 (W3O3) de genótipo *MATa* Δ ade2-1 Δ his3-11,15 Δ leu2-3,112 Δ trp1-1 Δ ura3-1 Δ can1-100 Δ ssd1-d, uma das cepas de *S. cerevisiae* mais utilizadas na atualidade que, inclusive, tem genoma completo sequenciado e anotado (MORTIMER; JOHNSTON, 1986; ROTHSTEIN, 2007, 1977, 1983; ROTHSTEIN; ESPOSITO; ESPOSITO, 1977; ROTHSTEIN; SHERMAN, 1980a, 1980b; SHERMAN et al., 1974; SZOSTAK; BLACKBURN, 1982; THOMAS; ROTHSTEIN, 1989; ZANELLI; VALENTINI, 2005). Com esta cepa, obteve-se sucesso na transformação e várias colônias transformantes foram observadas. Sendo que quatro colônias distintas foram isoladas e utilizadas para os demais experimentos; ou seja, tem-se quatro exemplares numerados de 1 a 4 de cada uma das seguintes leveduras: W3O3-pRS313, W3O3-pRCO1, W3O3-pRCO2, W3O3-pRCO3, W3O3-pRCT1, W3O3-pRCT2, e W3O3-pRCT2Mut1.

4.4 Avaliação da Função *splicing* do *Intein* CnePrp8 e da Funcionalidade da Proteína Ura3

4.4.1 Crescimento e Sensibilidade à Temperatura das Leveduras Transformadas Nos Meios SC –His, SC –His –Ura e 5-FoA

Foram testadas todas as leveduras transformantes, ou seja, quatro exemplares de colônias distintas de cada uma das sete transformações. O resultado do crescimento das leveduras para cada meio é descrito na [Tabela 3](#) e ilustrado na [Figura 17](#).

A construção teste pRCT1 e seu controle direto, o pRCO2, não apresentaram o padrão de crescimento esperado ([Tabela 1](#)); já as demais construções se comportaram como o esperado.

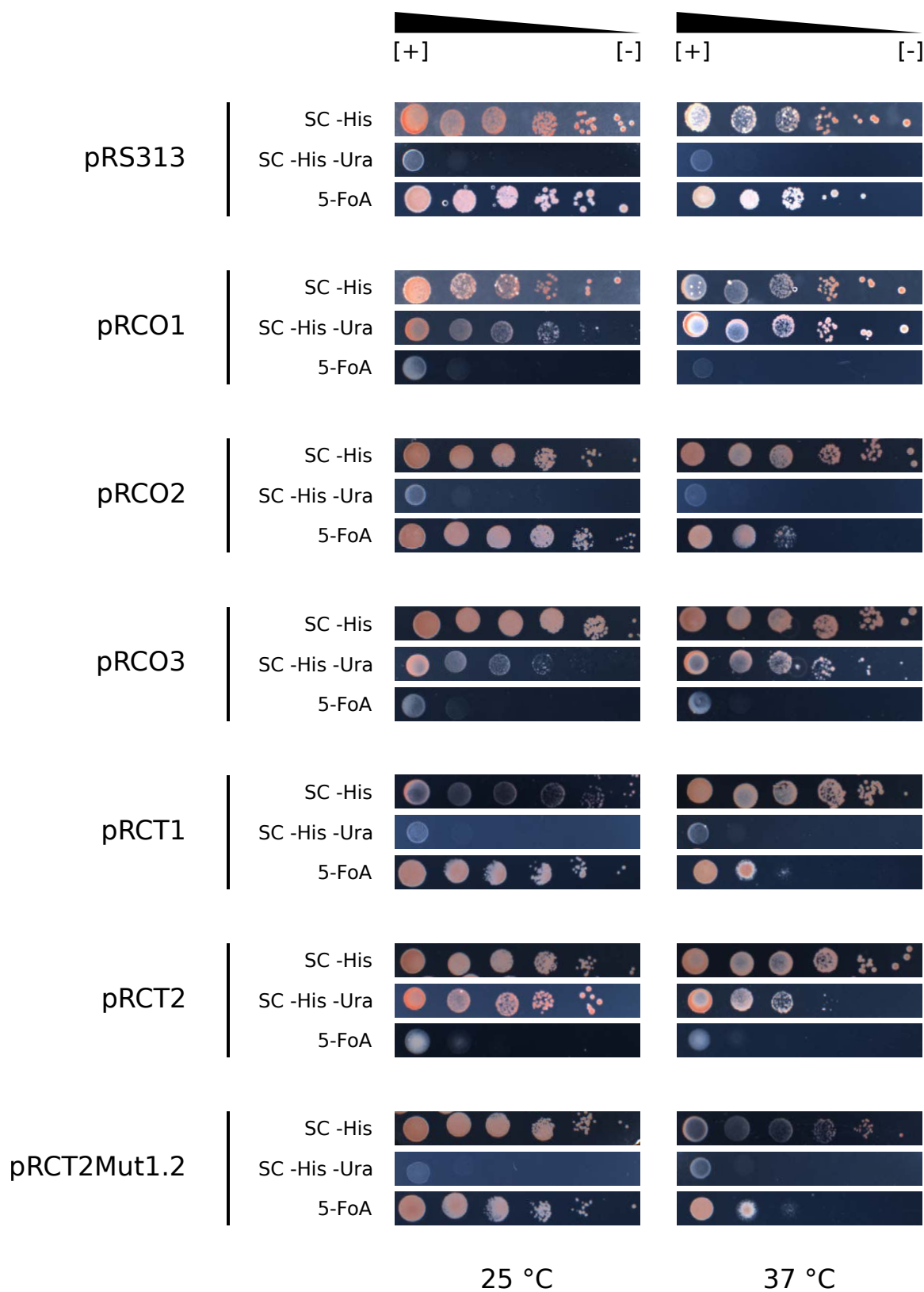
Tabela 3 – Padrão de crescimento das leveduras transformadas com o pRS313- \emptyset e as construções nos meios SC -His, SC -His -Ura e 5-FoA, após crescimento em 25 °C e 37 °C.

Amostras	#Colônia (Replicata)	Meios de Crescimento e Temperaturas					
		SC -His		SC -His -Ura		5-FoA	
		25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C
W303-pRS313	1	++	++	-	-	++	++
	2	++	++	-	-	++	++
	3	++	++	-	-	++	++
	4	++	++	-	-	++	++
W303-pRCO1	1	++	++	++	++	-	-
	2	++	++	++	++	-	-
	3	++	++	++	++	-	-
	4	++	++	++	++	-	-
W303-pRCO2	1	++	++	-	-	++	++
	2	++	++	-	-	++	++
	3	++	++	-	-	++	++
	4	++	++	-	-	++	++
W303-pRCO3	1	++	++	++	++	-	-
	2	++	++	++	++	-	-
	3	++	++	++	++	-	-
	4	++	++	++	++	-	-
W303-pRCT1	1	++	++	-	-	++	+
	2	++	++	-	-	++	+
	3	++	++	-	-	++	+
	4	++	++	-	-	++	+
W303-pRCT2	1	++	++	++	+	-	-
	2	++	++	++	+	-	-
	3	++	++	++	+	-	-
	4	++	++	++	++	-	-
W303-pRCT2Mut1,2	1	++	++	-	-	++	++
	2	++	++	-	-	++	++
	3	++	++	-	-	++	++
	4	++	++	-	-	++	++

Fonte: autoria própria.

Nota: Os dois sinais de adição juntos (++) mostram que houve crescimento em todas as diluições; Apenas um sinal de adição (+) mostra que houve crescimento até a segunda diluição; e, por fim, o sinal de subtração (-) mostra que não houve crescimento ou, no máximo, houve um leve crescimento residual na primeira diluição. Para os resultados do crescimento das leveduras cuja sumarização é representada nesta tabela, visitar o [Apêndice C](#).

Figura 17 – Teste de sensibilidade à temperatura.



Fonte: autoria própria.

Padrão de crescimento das leveduras transformadas com o pRS313-∅ e com o pRS313 contendo as construções CO1, CO2, CO3, CT1, CT2 nos meios SC -His, SC -His -Ura e 5-FoA, utilizando diluições seriadas, e crescimento a 25 °C e 37 °C.

4.4.2 Influência da Cisplatina no *splicing* do *Intein* CnePrp8 em Ura3

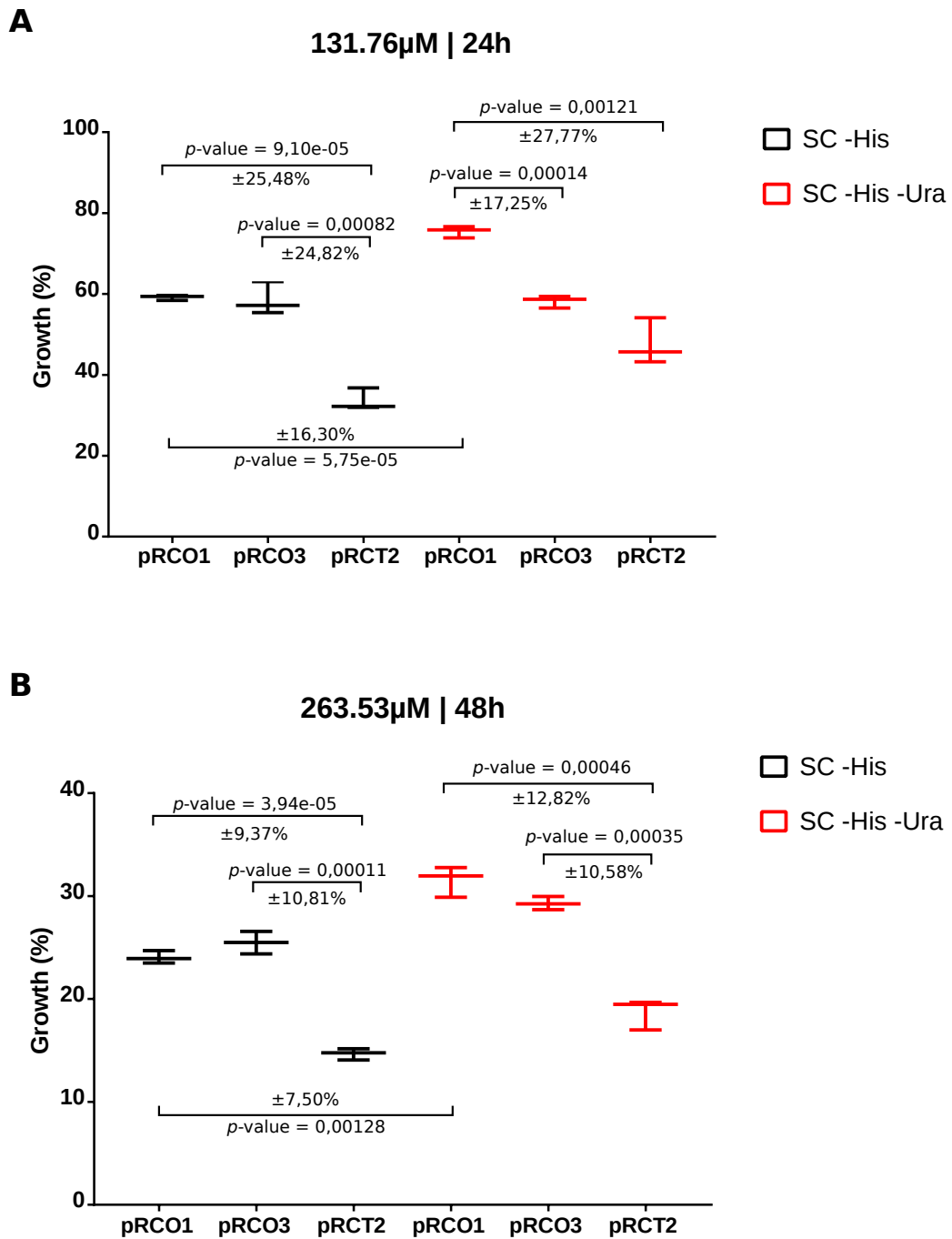
A fim de determinar a influência da Cisplatina no *splicing* do *intein* CnePrp8 em Ura3, procedeu-se o crescimento das cepas transformantes de *S. cerevisiae* em meios apropriados (meio SC –His para pRS313, pRCO2, pRCT1 e pRCT2Mut1; e SC –His –Ura para pRCO1, pRCO3 e pRCT2) em diferentes concentrações de Cisplatina (??). Independente da construção, do meio e do tempo, a Cisplatina mostrou-se tóxica para células de *S. cerevisiae*, inibindo 50 % do crescimento das células (IC₅₀) em uma concentração teórica de 201,65 μ M (??).

As concentrações de cisplatina de 131,76 μ M e de 263,53 μ M foram as que apresentaram maiores diferenças entre as construções e os controles; sendo que a pRCT2, nos meios SC –His e SC –His –Ura, teve seu crescimento mais afetado (Apêndice D). Os pontos de maior diferença entre as construções foram a 131,76 μ M em 24 h e a 263,53 μ M em 48h. Para melhor análise do crescimento nestas concentrações, plotou-se *boxplots* destes dados e aferiu-se suas significâncias estatísticas (Figura 18).

Independente do tempo e analisando apenas o meio SC –His, as construções controles pRCO1 e pRCO3 se comportam de modo extremamente similar, e a construção teste com o *intein*, o pRCT2, tem crescimento significamente comprometido (Figura 18A e Figura 18B), mesmo não precisando da Ura3 funcional neste meio. Na concentração de 131,76 μ M, após 24 h de crescimento no meio SC –His –Ura, o controle pRCO3 teve crescimento menor do que o controle pRCO1; sendo que, apesar da construção pRCT2 ter sido a que teve crescimento mais afetado pela adição da Cisplatina, não houve diferenças significativas entre esta e o seu controle direto (Figura 18A). Já à concentração de 263,57 μ M, após 48 h de crescimento no meio SC –His –Ura, as construções controle se comportam de modo similar entre si, e verificou-se uma queda significativa no crescimento do pRCT2.

Sabendo-se destes resultados, um novo experimento foi necessário com foco nas concentrações de Cisplatina que geraram crescimento diferencial entre as construções (Figura 19). No entanto, pelos testes de crescimento, não foi possível confirmar que a Cisplatina pode atuar *in-vivo* de modo a inibir o *splicing* do CnePrp8i no sistema aqui

Figura 18 – Pontos de com maior influência da Cisplatina no *splicing* do CnePrp8i.



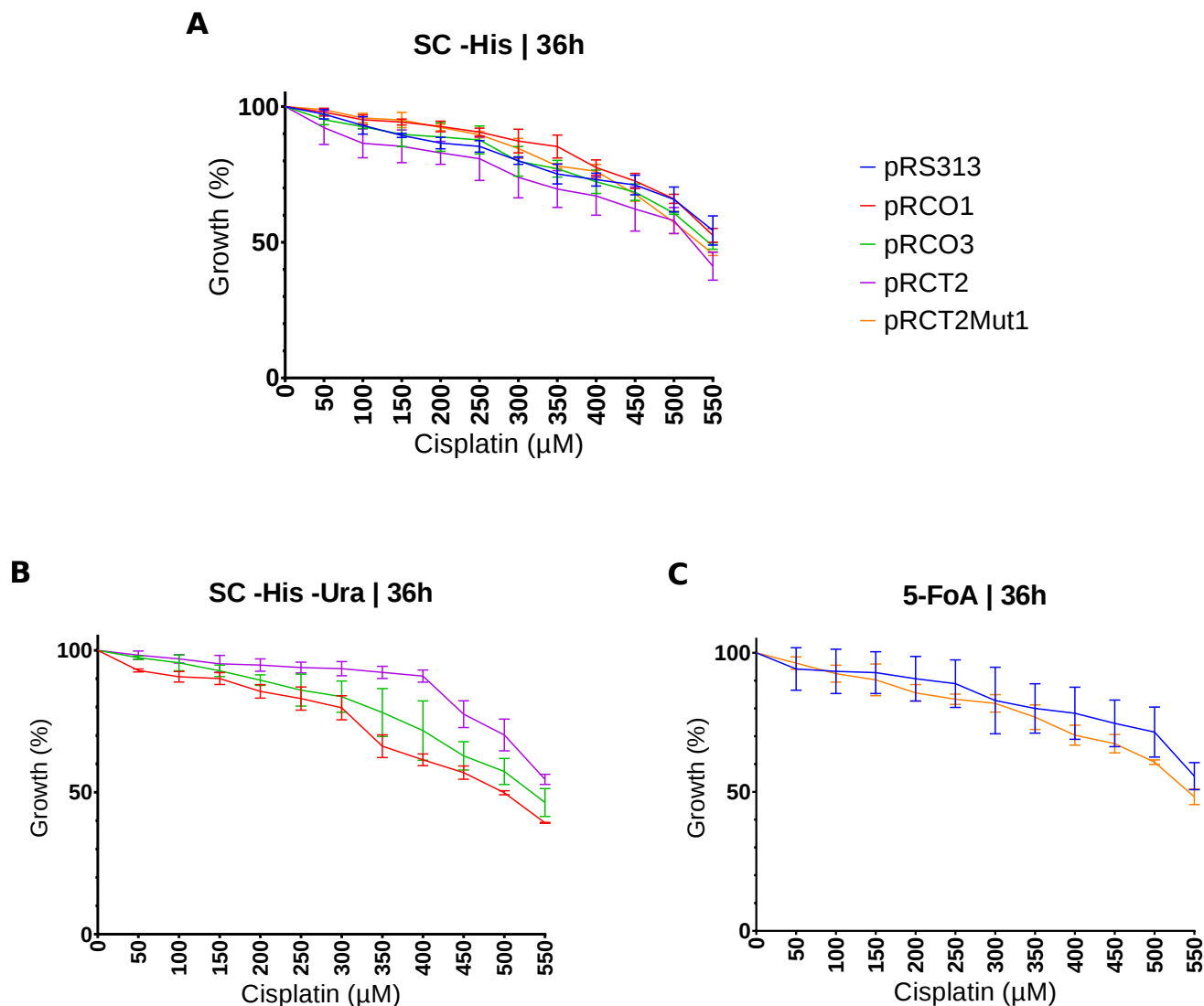
Fonte: autoria própria.

Pontos de maior diferença de crescimento entre as construções sob influência das concentrações de cisplatina (a) a 131,76 μ M em 24 h e (b) a 263,53 μ M em 48 h.

Foram considerados como significativos as comparações dos grupos com p -value $\leq 0,005$, obtidos pelo t -test de Student, dando, assim, uma confiança de 99,5%. Todos os valores de p -value da comparação entre os grupos de significância biológica estão sumarizados no [Apêndice E](#).

proposto.

Figura 19 – Diferença do crescimento de 48 h para o de 24 h.



Fonte: autoria própria.

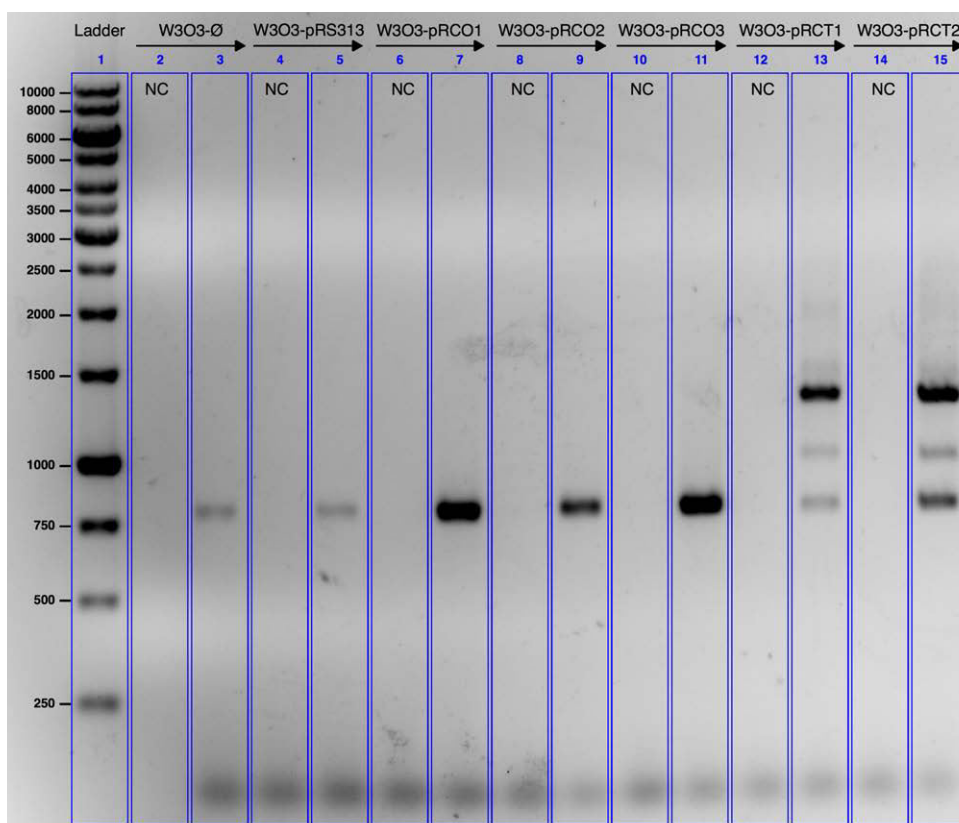
(a) Crescimento de todas as leveduras transformantes em meio SC –His em 36h ao longo das concentrações; (b) crescimento das leveduras transformadas com pRCO1, pRCO3 e pRCT2 em meio SC –His –Ura em 36h ao longo das concentrações; (c) crescimento das leveduras transformadas com pRS313 e pRCT2Mut1 em meio 5-FoA em 36h ao longo das concentrações. Todas as leveduras foram teste crescimento testado em todos os meios, e os resultados corroboraram com o teste de sensibilidade a temperatura (Tabela 3 e Figura 17) – para facilitar a visualização dos dados, as leveduras que não apresentaram crescimento foram removidas do gráfico.

4.5 Análise da Expressão Gênica

4.5.1 Análise do RNA Mensageiro Transcrito (Transcrição Reversa e PCR)

O PCR do cDNA sintetizado a partir de todos os mRNAs isolados das leveduras transformantes com as diferentes construções apresentou bandas de cerca de 1400pb para o cDNA sintetizado a partir do RNA extraído das leveduras transformantes que possuem as construções teste (com o *intein* CnePrp8) e banda de aproximadamente 845 pb para as construções controle (sem o *intein*); a diferença entre estas bandas é de, aproximadamente, 555 pb - que corresponde ao tamanho do *intein* CnePrp8 (Figura 20). Ou seja, neste experimento verificou-se que em nossa construção não existia *splicing* a nível de RNA.

Figura 20 – RT-PCR com para o gene *URA3* de *S. cerevisiae*

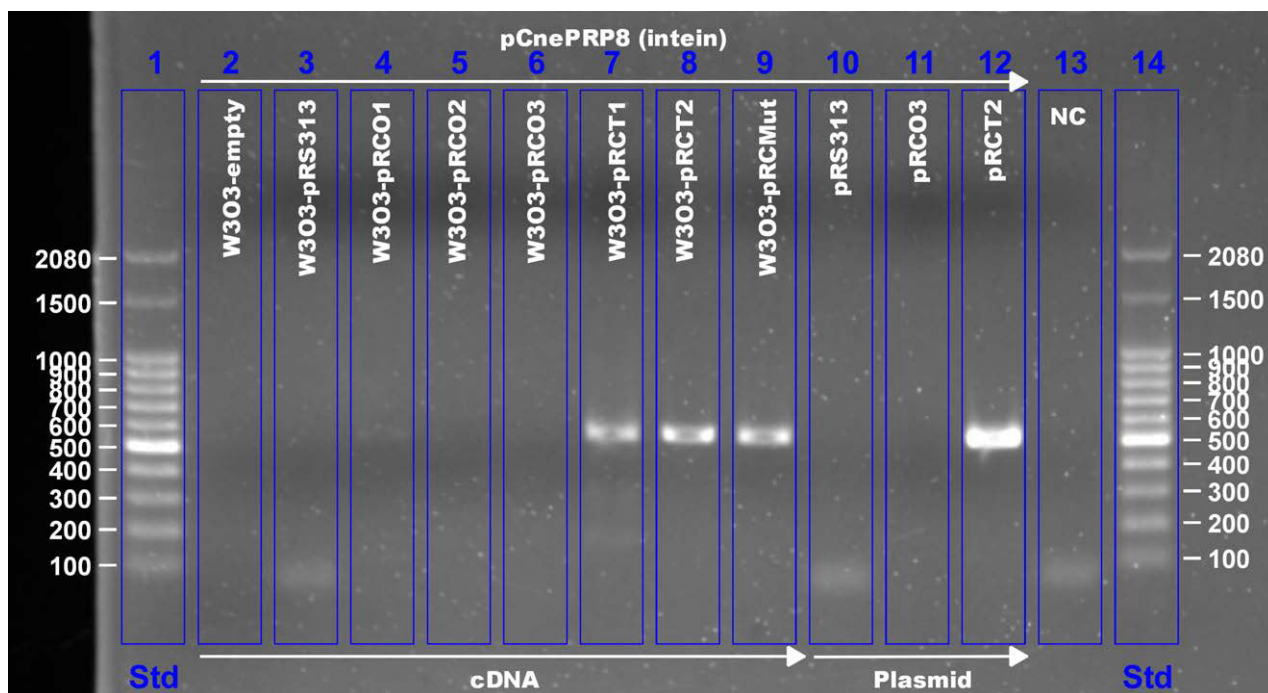


Fonte: autoria própria.

Verificação da presença do *intein* CnePrp8 no RNAm obtido das leveduras transformadas. Amplificação do cDNA obtido das leveduras transformadas W303-Ø, W303-pRS313, W303-pRCO1, W303-pRCO2, W303-pRCO3, W303-pRCT1 e W303-pRCT2 com os *primers* p3s e p102s.

Nas construções teste, uma banda intermediária de aproximadamente 1200pb foi observada. A fim de garantir que o *intein* está nestas construções, desenhou-se os *primers* pCnePrp8-Intein_F e pCnePrp8-Intein_R que amplificam o *intein* Prp8 inserido no *URA3*, apresentando banda de 509pb (Figura 21).

Figura 21 – RT-PCR com para o CnePrp8i em *S. cerevisiae*



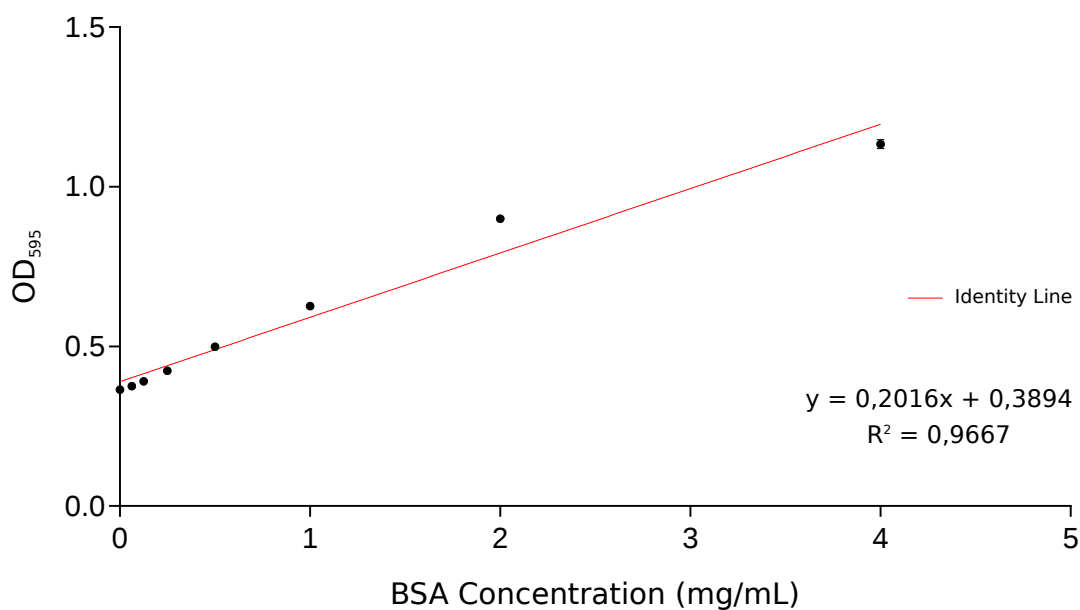
Fonte: autoria própria.

Eletroforese de produto de PCR utilizando os *primers* pCnePrp8i_f e pCnePrp8i_r.

4.5.2 Análise da Proteína Ura3 Expressa (Extração Proteica e Detecção Proteica)

A quantificação dos extratos proteicos dos lisados celulares deu-se pelo método de Bradford. A calibragem do método foi feita de com BSA, obteve-se, então, a curva padrão e a função que a descreve (Figura 22).

Figura 22 – Curva Padrão da quantificação pelo método de Bradford.



Fonte: autoria própria.

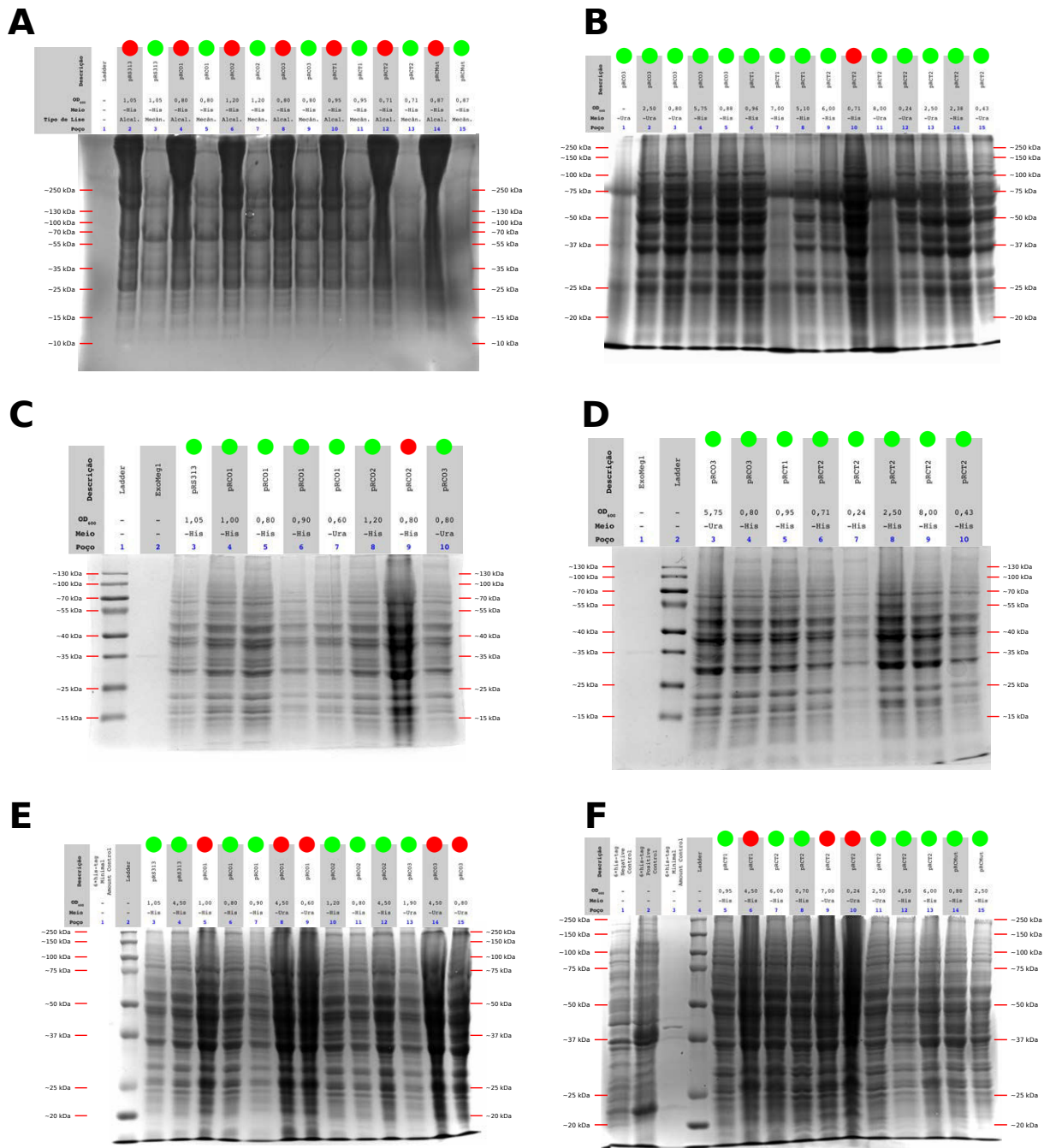
Os pontos em preto são as densidades ópticas obtidas e em vermelho a linha de tendência.

A concentração dos extratos proteicos obtidos (Apêndice F) variaram de 0,7 a 9,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ – algumas destas amostras foram analisadas por SDS-Page seguidas por coloração por CBB (Coomassie Brilliant Blue) e/ou pelo reagente *InVision* (Apêndice F - amostras de #1 até #32); já para outras amostras se fez apenas extração por lise mecânica e majoritariamente utilizadas para o *Western Blot* (Apêndice F - amostras de #33 até #40).

Com a concentração dos extratos proteicos aferida, separou-se 7,0 μg dos extratos proteicos por SDS-Page com posterior coloração por CBB (Figura 23).

Os SDS-Pages evidenciaram que as extrações feitas pelo protocolo de lise alcalina, apesar de apresentarem maior concentração proteica (Apêndice F), apresentam proteínas

Figura 23 – Eletroforese de proteínas por SDS-Page com coloração por CBB



Fonte: autoria própria.

(a) Primeiro gel, onde compara-se os dois protocolos de extração proteica; (b – f) géis posteriores para seleção das melhores amostras e melhor intervalo de OD₆₀₀ para extração.

Os círculos vermelhos (●) significam que foi feita extração utilizando lise alcalina; já os círculos verdes (●) significam que utilizou-se de lise mecânica.

menor qualidade quando comparadas às extrações feitas por lise mecânica (Figura 23, principalmente a Figura 23A). Exatamente por isto, para as demais análises se utilizou majoritariamente das extrações feitas por este último protocolo.

Utilizando ferramentas apropriadas¹, estimou-se os tamanhos das proteínas desenvolvidas neste trabalho (Tabela 4).

Tabela 4 – Tamanhos preditos das proteínas utilizadas neste trabalho.

Proteína	Tamanho Total (kDa)	Tamanho (kDa) com <i>splicing</i>	Tamanho (kDa) sem <i>splicing</i>
Ura3	28.89	-	-
CO1	29.67	-	-
CO2	30.70	-	-
CO3	30.43	-	-
CT1	50.42	30.70	50.42
CT2	50.15	30.43	50.15
CT2Mut1.2	50.07	30.59	50.07
eIF5a	17.12	-	-

Fonte: autoria própria.

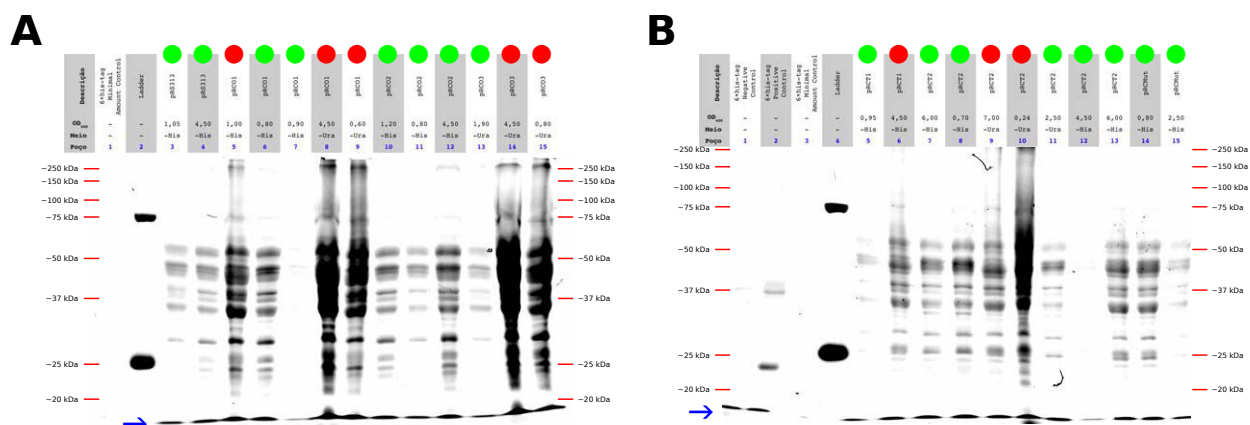
Nota: Tamanho predito baseado na sequência das proteínas desenhadas neste trabalho utilizando a ferramenta *Protein Molecular Weight Calculator* do *ScienceGateway*. Em fonte vermelha está a forma menos parcimoniosa de ser encontrada, e em verde as forma mais parcimoniosa de ser encontrada.

Após as seleções das melhores amostras, SDS-pages espelhos dos géis apresentados na Figura 23E e na Figura 23F foram feitos e utilizados para a coloração com pelo *InVision*, que possui Cobalto em sua composição e liga-se, predominantemente, em resíduos de Histidina.

O gel corado pelo *InVision* não mostrou, de forma específica, a banda relacionada à nossa proteína de interesse. Inúmeras outras proteínas foram coradas, prejudicando, assim, a visualização da proteína de interesse (Figura 24A e Figura 24B).

Diferentemente da coloração obtida pelo método do *InVision*, os *Western Blots* com anticorpos específicos não apresentaram alto *background*, tornando, inclusive, possível a semiquantificação relativa (Figura 25A e Figura 25B, respectivamente). Com o anticorpo

¹ Disponível em <https://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>.

Figura 24 – SDS-PAGE corado com *InVision*.

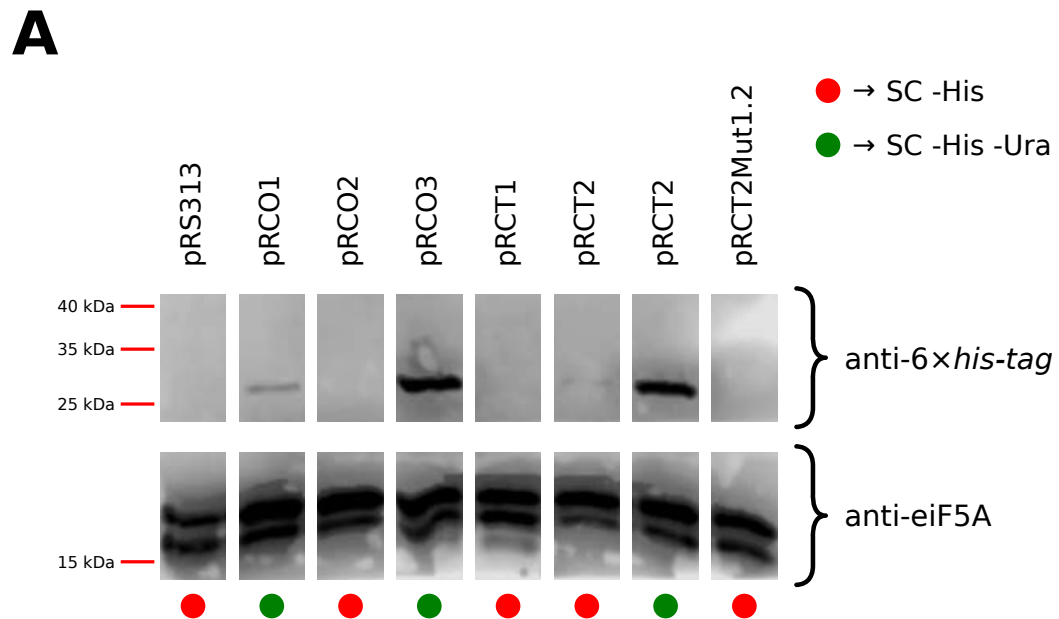
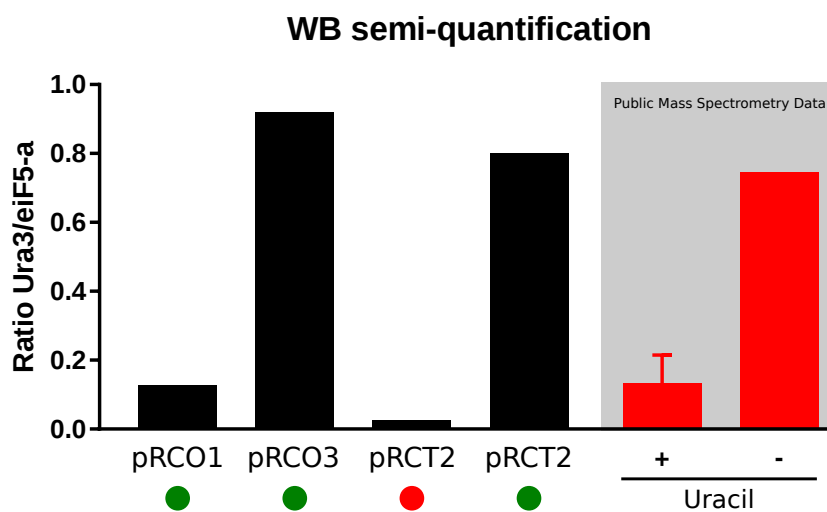
Fonte: autoria própria.

Amostras identificadas por nome, meio de crescimento e OD₆₀₀ no momento da extração. A última banda evidenciada nas canaletas com amostras de proteínas extraídas, com baixíssimo peso molecular, é o controle de carregamento de amostra – evidenciado com a seta azul (→). Como controle negativo, utilizou-se extrato proteico total de bactéria não expressando proteína fusionada com 6×*his-tag* (B – poço 1). Como controle positivo, utilizou-se extrato proteico total de bactéria super expressando proteína fusionada com 6×*his-tag* com 23 kDa (B – poço 2).

Adicionalmente, colocou-se a proteína ExoMeg1 de 37 kDa na quantidade possível de detecção pelo sistema (A – poço 1 e B – poço 3). O marcador utilizado apresenta duas das oito bandas com 6×*his-tag*, funcionando como controle positivo adicional, sendo estas as bandas de 75 kDa e 25 kDa.

Os círculos vermelhos (●) significam que foi feita extração utilizando lise alcalina; já os círculos verdes (●) significam que utilizou-se de lise mecânica.

anti-6×*his-tag*, apenas foi possível encontrar bandas mais evidentes da proteína Ura3 nos meio SC –His –Ura, meio no qual a expressão de Ura3 é indispensável para o crescimento; observa-se ainda uma banda com quantidade de proteína de interesse pouco acima do limite de detecção da técnica para a construção pRCT2 em meio SC –His, no qual as células não necessariamente precisam produzir uracil endógeno para o seu crescimento (Figura 25A). Na quantificação relativa, utilizando a proteína eiF5a como normalizador, vê-se que as quantidades de Ura3 produzidas pelas células transformadas ou com o pRCO3 ou com o pRCT2 tem expressão relativa basicamente igual, enquanto as células transformadas com o pRCO1 tem expressão relativa menor que as demais (Figura 25B).

Figura 25 – *Western Blots* e sua quantificação relativa.**B**

Fonte: autoria própria.

(a) Na parte superior da figura tem-se o *Western Blot* com o anticorpo anti-6×his-tag, evidenciando assim as Ura3 produzidas neste trabalho; e na parte inferior tem-se o *Western Blot* com o controle de carregamento de amostra de uma proteína *housekeeping* de expressão padrão. (b) Semi-quantificação relativa dos *Western Blots* anteriores utilizando a relação Ura3/eiF5a; a área sombreada com gráficos vermelhos traz o resultado da relação Ura3/eiF5a acessada a partir de dados de espectrometria de massas de proteoma total de *S. cerevisiae* em duas situações diferente: meio com a presença de Uracila (+) e em meio com baixa disponibilidade de Uracila (-).

5 Discussão

O *intein* Prp8 encontrado em fungos patogênicos humanos é um potencial alvo terapêutico já que se encontra em um dos genes mais conservados dentre os eucariotos e é essencial para a sobrevivência da célula hospedeira. Uma vez inibido o *splicing* do *intein*, a proteína Prp8 resultante não seria mais funcional, interrompendo assim a sobrevivência e proliferação da célula fúngica. Como o sítio de inserção do *intein* Prp8 é conservado entre estes patógenos, a descoberta de uma droga que iniba o *splicing* proteico poderia ter um amplo espectro de ação (LIU; YANG, 2004). Sendo assim, o estudo do funcionamento do domínio Spl (*splicing*) deste *intein* é de extrema importância e este foi um dos objetivos deste estudo.

Pela primeira vez, o *splicing* de um *intein* fúngico, o CnePrp8 de *C. neoformans*, em um modelo de *extein* (Ura3) e microrganismo (*S. cerevisiae*) não nativos foi testado. Outros autores (LIU; YANG, 2004; THEODORO et al., 2011) já avaliaram anteriormente a atividade *splicing* do *intein* Prp8 em uma proteína hospedeira não-nativa (Maltose Binding Protein e Tioredoxina), em *E. coli*, para as espécies *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *H. capsulatum*, *C. neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii*, *Blastomyces dermatitidis* e *Emmonsia parva*. Nestes trabalhos, o *intein* foi inserido no plasmídeo de expressão pMST entre os sítios XhoI e AgeI, sendo flanqueado por uma proteína ligadora de maltose (maltose binding protein, MBP) no N-terminal e por uma tireodoxina no C-terminal. No sistema utilizado, impreterivelmente, *Western Blots* eram feitos com anticorpo anti-tireodoxina para identificar a proteína precursora e a excisada pelos seus tamanhos deduzidos. Tal metodologia, porém, não é prática para ser aplicada em sistemas de seleção de drogas que inibam o *splicing*. Assim, ao inserir o *intein* CnePrp8 no gene *URA3* de *S. cerevisiae*, objetivou-se criar um sistema de *screening* de drogas baseado em duas abordagens: a seleção positiva (crescimento associado ao *splicing*, quando em meio sem uracila) e a seleção negativa (crescimento associado à ausência de *splicing*, quando em meio 5-FoA), conforme explanado anteriormente.

Apesar da robustez do *splicing* dos *inteins*, evidenciado em inúmeros modelos não nativos, um dos principais desafios deste projeto foi inserir o *intein* Prp8 em um local da proteína Ura3, onde os resíduos do *extein* Prp8 (aminoácidos flanqueadores do *intein* em *C. neoformans* e que permanecem na proteína após o *splicing* do *intein*) não alterassem a funcionalidade de Ura3. Isto porque, diferente do que foi feito pelos dois autores supracitados, nosso objetivo é relacionar a ocorrência ou não do *splicing* do *intein* a um fenótipo facilmente identificado, relacionado a funcionalidade da proteína Ura3.

Mesmo se enfrentando dificuldades, a ligação e subclonagem dos insertos que estavam no pUC57 para o pRS313 foi possível, assim como a obtenção da construção controle do não-*splicing*, o pRCT2Mut1, por mutação sítio dirigida. Contudo o sequenciamento da construção pRCT2Mut1 apontou uma deleção de uma timina (T) exatamente no ponto da segunda mutação sítio dirigida, muito provavelmente ocasionado por um problema na síntese do *primer* reverso correspondente. O pRCT2Mut1 está correto e, teoricamente, trocando-se apenas um dos resíduos essenciais para o *splicing* já é o suficiente para inviabilizá-lo. Posteriormente se fará seleção de outras colônias bacterianas transformantes do produto de ligação para geração do pRCT2Mut1 ou utilizar-se-á apenas o pRCT2Mut1, que também é perfeitamente adequado para este trabalho.

Após a obtenção dos transformantes na cepa W3O3 e feito o teste de sensibilidade à temperatura, se observou que a $6\times his\text{-}tag$ adicionada à Ura3 não influenciou a atividade desta enzima (pRCO1). No entanto, os resíduos de aminoácidos modificados na construção pRCO2 afetam a atividade da Ura3 produzida, portanto a construção pRCT1 não pode ser utilizada já que, assim como seu controle, esta não cresce em meios onde há a necessidade de produção do uracila de forma endógena, mesmo que a inserção do *intein* tenha sido realizada em uma região mais maleável da proteína e que não é diretamente associada à sua atividade. Os resíduos de aminoácidos modificados no pRCO3 não afetaram a atividade de enzima Ura3, validando, portanto, o uso do pRCT2; leveduras transformadas com o pRCT2 crescem em meio SC –His –Ura e não crescem em meio 5-FoA, indicando que o *intein* CnePrp8 inserido neste local sofre o *splicing* corretamente e os resíduos do *extein* Prp8 não alteram a funcionalidade de Ura3. Nesta construção, o *intein* CnePrp8 foi inserido no

limite da interface do dímero (Ura3 é uma proteína dimérica) no sítio ...KGSLSTGE..., o qual foi modificado para ...KA<*intein*>SGLSTGE..., ou seja, apenas foi feita uma substituição de aminoácido (G para A) e uma adição de uma G depois do *intein*. Apesar de localizado em uma interface de dímero, próximo a regiões muito conservadas de Ura3, o sucesso desta construção provavelmente se deve ao fato de que se aproveitou os próprios resíduos de Ura3 como *extein* flangeador do *intein*, realizando-se alterações mínimas na proteína nativa. Para pRCT2Mut1, na qual a atividade do correto *splicing* do *intein* foi interrompida, não há crescimento em SC –His –Ura.

O *splicing*, sendo aferido pelo crescimento nos três diferentes meios, é eficientemente robusto à 25 °C e a 37 °C, mas com leve diminuição no crescimento a 37 °C – muito provavelmente causado por diversos outros motivos não-diretamente ligados ao *splicing* já que *S. cerevisiae* tem crescimento melhor observado a 28 °C.

As cepas de *S. cerevisiae* AD1-7 e AD1-9, com múltiplas deleções em genes codificadores de transportadores ABC, não puderam ser transformadas usando protocolos testados com todas as construções aqui utilizadas. Tais leveduras são sabidamente mais difíceis de serem transformadas e outros protocolos de transformação poderão ser testados futuramente (informações pessoais da Dr^a. Danuza Rossi).

Outro passo extremamente importante foi identificar se o *intein* estava sofrendo *splicing* à nível de RNA mensageiro; tal hipótese foi descartada, uma vez que os testes feitos com RT-PCR com *primers* que se anelam na porção codante do gene *URA3* (codificando as regiões N-terminal e C-terminal de sua respectiva proteína) e os *primers* que se anelam nas porções N-spl e C-spl do *intein* CnePrp8 mostram que o *intein* no sistema aqui proposto não sofre *splicing* à nível de RNAm. A cepa W303 possui uma deleção no primeiro nucleotídeo codante do seu gene *URA3* genômico, que logo gera um *stop codon* e durante na tradução produz uma proteína truncada de baixíssimo peso molecular e que não possui atividade (MORTIMER; JOHNSTON, 1986; ROTHSTEIN, 2007, 1977, 1983; ROTHSTEIN; ESPOSITO; ESPOSITO, 1977; ROTHSTEIN; SHERMAN, 1980a, 1980b; SHERMAN et al., 1974; SZOSTAK; BLACKBURN, 1982; THOMAS; ROTHSTEIN, 1989; ZANELLI; VALENTINI, 2005); como há a transcrição, o RT-PCR com primers para o

gene *URA3* mostram fracas bandas até para as células que não foram transformadas com a construção em *URA3*.

O próximo passo foi validar os resultados obtidos para o crescimento pelo método do *InVision* e por *Western Blot* com anticorpo anti-6×*his-tag*; ambos os métodos detectando a 6×*his-tag* inserida na porção N-terminal feitas neste trabalho.

Os resultados do *InVision* não são específicos para a proteína de interesse, pois a ligação inespecífica do cobalto a resíduos de histidina de outras proteínas inviabilizou a detecção exata das proteínas de interesse, sendo que nenhuma banda específica de 30 ou 50 kDa (Ura3 sem o *intein* ou com ocorrência de *splicing*, e Ura3 com *intein* ou sem ausência de *splicing*, respectivamente) foram detectadas. Porém, tal reagente marca muitas proteínas de *S. cerevisiae*, sendo mais indicado para super-expressão de proteínas com 6×*his-tag* em *E. coli*. Apesar de inespecífico e inconclusivo, nota-se que na coloração pelo *InVision*, a presença de uma banda de cerca de 30 kDa que, mesmo após longo tempo de descoloração, está presente em todas as construções, exceto no plasmídeo vazio, o pRS313-Ø, à OD₆₀₀ de 1,05. Como tal banda ocorre tanto nas leveduras transformadas por pRCT1 e pRCT2, se de fato representar Ura3, isso seria um indicativo que pRCT1 sofre *splicing* assim como pRCT2, porém os resíduos de Prp8 inseridos e remanescentes no pós-*splicing* fazem desta Ura3 uma proteína não funcional. É importante ressaltar que bandas de cerca de 30 kDa estão presentes em todas as construções – incluindo um dos extratos das leveduras transformadas com o plasmídeo vazio (pRS313-Ø com OD₆₀₀ de 4,5) –, mas conclusões sobre este resultado são extremamente frágeis e má sustentadas isoladamente, reforçando a importância do *Western Blot*.

O *Western Blot* evidenciou que a expressão do Ura3 apenas é detectada na ausência de uracila do meio, este achado está de acordo com a literatura sobre regulação do gene *URA3* e da proteína Ura3, segundo a qual a expressão de *URA3* é aumentada em até mais de cinco vezes na ausência de uracila (ROSE; GRISAFI; BOTSTEIN, 1984; ROY; EXINGER; LOSSON, 1990). Não se encontrou dados na literatura analisando exatamente as variações à nível proteico da proteína Ura3 em meios com presença e ausência de uracil, então fez-se uma busca por dados de quantificação proteômica total de *S. cerevisiae* e se

fez a mesma relação Ura3/eiF5a para comparação direta com o *Western Blot*, e assim confirmou-se que à nível proteico tal variação também é observável e a expressão, de fato, culmina no aumento de Ura3 quando esta é requerida.

O sistema aqui proposto para avaliação do *splicing* de *inteins* e sua possível inibição trata-se de um sistema *in vivo*. Sistemas *in vitro* isolam apenas o intein em uma determinada proteína hospedeira que possa ser informativa sobre a ocorrência ou inibição do *splicing*, assim sendo, com o alvo desejado isolado, se maximiza a exposição às drogas testadas, dando alta sensibilidade nesta abordagem; já nos sistemas *in vivo* o alvo não está isolado e a droga está exposta a uma ampla gama de possíveis alterações enzimáticas, metabolizações que podem inviabilizá-la e, até mesmo, *off-targets*, exposições estas que também são enfrentadas pela droga caso ela chegue a uso clínico (SINK et al., 2010). Por estarem muito distantes das condições reais, sistemas *in vitro* apresentam mais falsos positivos quando comparados aos sistemas *in vivo*, em contrapartida apresentam maior sensibilidade. De um modo geral, tem-se que drogas selecionadas por sistemas *in vitro* não necessariamente funcionam na prática, mas podem elucidar e possíveis classes de moléculas que tenham perspectivas de potencial terapêutico e, assim, direcionar a busca. Ambos os sistemas podem ser adaptados e escalonados para sistemas *high-throughput* de *screening*, sendo esta uma etapa essencial, pois confere a possibilidade de testar uma grande quantidade de moléculas e compostos (MAJOR, 1998). Não se visa a substituição dos sistemas *high-throughput* de *screening* para detecção *in vitro* de drogas inibidoras do *splicing* de *inteins* que já foram criados em detrimento do sistema aqui apresentado, mas sim utilizá-lo como um sistema adicional de validação.

A busca por inibidores do *splicing* de *inteins* não é recente, e inicialmente o zinco foi descrito como um inibidor reversível (GHOSH; SUN; XU, 2001; MILLS; PAULUS, 2001). Esta descoberta permitiu a modulação do *splicing* e o desenvolvimento de sistemas *high-throughput* para *screening in vitro*, mas sempre com *inteins* procarióticos (GANGOPADHYAY; JIANG; PAULUS, 2003) e com enfoque especial em seu potencial antimicobacteriano. À época, cerca de 85000 compostos foram testados (PAULUS, 2003) e, com aprovação de novos projetos, cerca de 290000 foram testados (“Protein Splicing

Inhibitors | Working Group for New TB Drugs”, [s.d.]), no entanto, apenas parte destes dados estão disponíveis. Cerca de 50 compostos, que atuaram como inibidores do *splicing* de inteins, foram detectados e apresentaram valores de IC_{50} em baixas concentrações da faixa de micromolar. A maioria dos inibidores identificados foram eletrófilos, portanto não sendo adequados para tratamento a longo prazo, e o mecanismo de ação molecular é a ligação de forma covalente ao resíduo de cisteína essencial para o *splicing* do *intein* (HENRY, 2006; PAULUS, 2007). Observa-se assim que são necessários esforços para atenuar a reatividade destes inibidores, ao mesmo passo que também são necessários esforços para a busca compostos de origem natural que possam inibir o *splicing* do *intein*.

Técnicas de síntese química e modificações moleculares são usuais no *design* de drogas (SCHUELER, 1964; TISHLER, 1964). Através destas técnicas, compostos que inibam o *splicing* de *inteins*, mas que também apresentem toxicidade em maníferos, podem ser quimicamente modificados e originar variados compostos análogos que potencialmente mantêm a atividade inibitória, mas com menor toxicidade. Sendo assim, um sistema *in vivo* que permita a fácil validação de dados obtidos por sistemas *in vitro*, além de seus compostos análogos variantes, é extremamente importante.

Compostos platinados, em especial a cisplatina, são conhecidos inibidores do *splicing* do *intein* RecA de *M. tuberculosis* e foi a única com a qual continuou-se pesquisas mais direcionadas (CHAN et al., 2016; ZHANG et al., 2011), muito provavelmente por ser a única a demonstrar inibição em sistemas *in vivo*; explica-se esta inibição pela possível ligação da cisplatina aos aminoácidos de cisteína extremamente importantes para que o ataque nucleofílico ocorra e o *intein* sofra seu *splicing* autocatalítico.

No sistema aqui apresentado, a cisplatina foi utilizada como um controle de inibição do *splicing* do CnePrp8i. Os resultados mostraram que a cisplatina atua com uma leve ou nenhuma inibição do *splicing* do *intein* da construção pRCT2, cujo correto *splicing* do *intein* está intrinsecamente ligado ao seu crescimento no meio SC –His –Ura. Interessantemente, as leveduras transformadas com o pRCO3 ao serem comparadas ao pRCO1, controle da $6\times his-tag$, também mostraram certa inibição pela Cisplatina, mas sempre menores do que as apresentadas pelas leveduras transformadas com o pRCT2. De

toda a inibição do crescimento observada pela Cisplatina, pouco mais de 1/3 (3,82 % dos 11,05 %) pode ser atribuída de forma direta à inibição do *splicing* do *intein* CnePrp8; tais diferenças aconteceram à concentração de 131,76 μM . Sendo que o IC_{50} da Cisplatina em *M. tuberculosis* é de aproximadamente 10 μM e no nosso sistema é de 201,65 μM ; tais diferenças de IC_{50} podem ser facilmente correlacionadas às diferenças bioquímicas e fisiológicas existentes entre micobactérias e leveduras, principalmente ao que se refere às proteínas de exportadoras de drogas (ROSSI; AÍNSA; RICCARDI, 2006; SÁ-CORREIA et al., 2009). Outro dado importante, que pode estar ligado a essa baixa inibição do *splicing* do CnePrp8i pela Cisplatina no sistema aqui proposto, é a grande diferença filogenética à nível de sequência do *intein* Prp8 de *C. neoformans* e o RecA de *M. tuberculosis*.

A cisplatina é uma excelente inibidora do *splicing* do *intein* RecA de *M. tuberculosis*, mas, de fato, não é uma boa inibidora do *splicing* do CnePrp8i, no sistema aqui proposto. Esta sutil inibição revela que a melhor droga de inibição do *splicing* conhecida não funciona para *inteins* de células fúngicas e reforça a importância da busca de novos inibidores com potencial terapêutico.

Ainda sobre as comparações feitas nos meios com a adição de Cisplatina, tem-se que meios que não fornecem uracil de forma endógena alteram sobremaneira o comportamento fisiológico e por alterações nas vias bioquímicas de *S. cerevisiae*, então relações diretas entre os meios SC –His ou 5-FoA com o SC –His –Ura são implausíveis sem a cuidadosa normalização dos dados com os controles utilizados neste trabalho (BASSO et al., 2010).

Avaliar o *splicing* de um *intein* em um modelo não nativo não é apenas importante para a seleção de drogas que tenham o potencial de inibir seu *splicing*, mas também para melhor compreensão da dinâmica do *splicing* proteico e os fatores fisiológicos que possam interferir em sua eficiência, assim, de um simples parasita, o *intein* passa a ser visto como um elemento modulador da expressão gênica à nível pós-traducional.

Inteins são normalmente encontrados em locais conservados de proteínas *house-keeping*, tais como DNA e RNA polimerases, aminoacil RNAt sintetases, recombinases, topoisomerases, helicases, e componentes essenciais do spliceossoma, como a Prp8 (GREEN; NOVIKOVA; BELFORT, 2018; LIU, 2000; NOVIKOVA et al., 2016; NOVIKOVA; TO-

PILINA; BELFORT, 2014). Algumas hipóteses para esta distribuição já existem e são, em parte, apoiadas por alguns cenários evolutivos, incluindo a transferência horizontal provável através de infecção por vírus, bem como pela mobilidade genética dos *inteins* pelo ciclo *homing*, o que significa que a propagação e aumento de este elemento seria devido a um processo de conversão de genes envolvendo uma quebra de cadeia dupla, seguido por uma recombinação homóloga, em vez de qualquer vantagem seletiva (GOGARTEN et al., 2002; GOGARTEN; HILARIO, 2006; NAGASAKI et al., 2005). Esta ideia rendeu aos *inteins* o título de elementos genéticos “parasitas” por quase trinta anos, embora alguns *inteins* domesticados, como o gene *HO* de *S. cerevisiae*, mostrou ter ganho de função na biologia celular (BAKHRAT et al., 2004).

Trabalhos recentes, no entanto, apontam para uma possível função para *inteins* na regulação pós-tradução da expressão gênica. Por exemplo, o *splicing* do *intein* SufB de *M. tuberculosis* mostrou ser inibido por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS), em modelo em *E. coli*, sendo que estas condições de *stress* também são experimentadas por *M. tuberculosis*, no interior do macrófago (TOPILINA et al., 2015b); adicionalmente, um dos *inteins* encontrados no DnaB de *Mycobacterium smegmatis* também sofre tal regulação (KELLEY et al., 2018). Outra evidência para o papel da regulação pós-traducional de *inteins* veio a partir da observação da mudança da atividade *splicing* de RadA no archaea hipertermófilo *Pyrococcus horikoshii* de acordo com a alta temperatura ou das condições da solução, bem como mutações pontuais remotas no *extein*. Os autores propõem que o *intein* RadA pode funcionar como um sensor ambiental, no qual o *intein* sofre *splicing* apenas em condições de crescimento ótimas, e seu *splicing* é diminuído em condições adversas, poupando o consumo de ATP sob condições de choque frio, por exemplo (TOPILINA et al., 2015a).

Estamos longe de uma compreensão clara e global sobre o motivo da persistência dos *inteins* em diferentes proteínas essenciais e muito menos do porque de tais elementos só ocorrem em seres unicelulares. Sem dúvida, o uso de modelos como o criado neste projeto poderá auxiliar não apenas na escolha de drogas inibidoras do *splicing* do *intein*, mas também trazer significativos avanços para a compreensão da razão evolutiva para sua

permanência nos genomas.

6 Conclusão

O modelo para a avaliação do *splicing* do *intein* CnePrp8 aqui proposto foi bem-sucedido, uma vez que uma das construções, a pRCT2, contendo o *intein* CnePrp8 no limite da interface do dímero Ura3, no sítio KGSLSTGE, modificado para ...KA<*intein*>SGLSTGE... se mostrou ideal para a avaliação do *splicing* do *intein* dependente de seu padrão de crescimento em meios sem uracila e 5-FoA.

O *intein* certamente não sofre *splicing* à nível de RNAm, pois bandas com a presença do *intein* ligados ao *extein* foram detectadas por RT-PCR. Ao *Western Blot*, não foi possível observar bandas precursoras pré-*splicing*, sendo este extremamente robusto e não sofrendo grande influência da temperatura.

Não se visa a substituição dos sistemas *high-throughput* de *screening* para detecção *in vitro* de drogas inibidoras do *splicing* de *inteins* pelo sistema aqui apresentado, mas sim utilizá-lo como um novo sistema que permite a rápida validação *in vivo* destas drogas, além de permitir a avaliação de moléculas análogas às previamente identificadas e possíveis sinergismos.

As aplicações deste sistema vão para além da busca por drogas inibidoras do *splicing* e podem extrapolar, inclusive, para uma maior compreensão da regulação fisiológica do *splicing* do *intein*. Além disto, este sistema pode ser facilmente adaptado para avaliação de outros *inteins*.

Referências

ARANKO, A. S.; WLODAWER, A.; IWAŃ, H. Nature's recipe for splitting inteins. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 27, n. 8, p. 263–271, 1 ago. 2014.

BAKHRAT, A. et al. Homology Modeling and Mutational Analysis of Ho Endonuclease of Yeast. **Genetics**, v. 166, n. 2, p. 721–728, fev. 2004.

BALLOU, E. R.; JOHNSTON, S. A. The cause and effect of *Cryptococcus* interactions with the host. **Current Opinion in Microbiology**, v. 40, p. 88–94, 1 dez. 2017.

BASSO, T. O. et al. Insufficient uracil supply in fully aerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* leads to respiro-fermentative metabolism and double nutrient-limitation. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 7, p. 973–977, 2010.

BONGOMIN, F. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 18 out. 2017.

BOWMAN, E. J.; TENNEY, K.; BOWMAN, B. J. **Isolation of genes encoding the *Neurospora vacuolar ATPase*. Analysis of *vma-1* encoding the 67-kDa subunit reveals homology to other ATPases.** **Journal of Biological Chemistry**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/263/28/13994.full.pdf>>. Acesso em: 3 set. 2018.

BRANDT, M. E. et al. Comparison of multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular subtyping of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 7, p. 1890–1895, jul. 1995.

BULMER, G. S.; SANS, M. D. *Cryptococcus neoformans*. II. Phagocytosis by human leukocytes. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 5, p. 1480–1483, 1 nov. 1967.

BULMER, G. S.; SANS, M. D.; GUNN, C. M. *Cryptococcus neoformans*. I. Nonencapsulated mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 5, p. 1475–1479, 1 nov. 1967.

BURT, A.; KOUFOPANOU, V. Homing endonuclease genes: the rise and fall and rise again of a selfish element. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 14, n. 6, p. 609–615, 2004.

BUTLER, M. I. et al. The distribution and evolutionary history of the PRP8 intein. **BMC Evolutionary Biology**, v. 6, n. 1, p. 42, jan. 2006.

BUTLER, M. I.; GOODWIN, T. J. D.; POULTER, R. T. M. A nuclear-encoded intein in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Yeast**, v. 18, n. 15, p. 1365–1370, nov. 2001.

BUTLER, M. I.; POULTER, R. T. M. The PRP8 inteins in *Cryptococcus* are a source of phylogenetic and epidemiological information. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 5, p. 452–463, maio 2005.

BYRNES III, E. J. et al. Molecular Evidence That the Range of the Vancouver Island Outbreak of *Cryptococcus gattii* Infection Has Expanded into the Pacific Northwest in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 7, p. 1081–1086, 1 abr. 2009.

CASADEVALL, A. et al. Continental Drift and Speciation of the *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Species Complexes. **mSphere**, v. 2, n. 2, p. 1–6, 2017.

CASADEVALL, A.; COELHO, C.; ALANIO, A. Mechanisms of *Cryptococcus neoformans*-mediated host damage. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. APR, p. 855, 2018.

CHAN, H. et al. Exploring Intein Inhibition by Platinum Compounds as an Antimicrobial Strategy. **The Journal of biological chemistry**, v. 291, n. 43, p. 22661–22670, 21 out. 2016.

CHONG, S.; XU, M.-Q. Harnessing Inteins for Protein Purification and Characterization. In: **Homing Endonucleases and Inteins**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. v. 16p. 273–292.

CIRAGAN, A. et al. Salt-inducible Protein Splicing in cis and trans by Inteins from Extremely Halophilic Archaea as a Novel Protein-Engineering Tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 23, p. 4573–4588, nov. 2016.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica**, v. 2013, p. 1–23, 9 jan. 2013.

COOPER, M. A. et al. A Convenient Split-Intein Tag Method for the Purification of Tagless Target Proteins. In: **Current Protocols in Protein Science**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2018. v. 91p. 5.29.1-5.29.23.

COX, G. M. et al. **Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis** **Infection and Immunity**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://iai.asm.org/>>. Acesso em: 17 ago. 2018.

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

CRAIG, R. et al. Using annotated peptide mass spectrum libraries for protein identification. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 8, p. 1843–1849, 2006.

CRAMPIN, A. C. et al. PCR fingerprinting *Cryptococcus neoformans* by random amplification of polymorphic DNA. **Medical Mycology**, v. 31, n. 6, p. 463–465, 1 jan. 1993.

CURRIE, B. P.; FREUNDLICH, L. F.; CASADEVALI, A. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (pigeon excreta) and clinical sources in New York City. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 1188–1192, maio 1994.

DESJARDINS, C. A. et al. Population genomics and the evolution of virulence in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Genome Res.**, v. 27, n. 7, p. 1207–1219, 2017.

DEUTSCH, E. W.; LAM, H.; AEBERSOLD, R. PeptideAtlas: A resource for target selection for emerging targeted proteomics workflows. **EMBO Reports**,

v. 9, n. 5, p. 429–434, 1 maio 2008.

DJORDJEVIC, J. T. Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, n. NOV, p. 125, 2010.

DLAKIC, M.; MUSHEGIAN, A. Prp8, the pivotal protein of the spliceosomal catalytic center, evolved from a retroelement-encoded reverse transcriptase. **Rna**, v. 17, n. 5, p. 799–808, maio 2011.

DOOLITTLE, R. F. **The Multiplicity of Domains in Proteins Annual Review of Biochemistry**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bi.64.070195.001443>>. Acesso em: 11 out. 2018.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1642–1644, jul. 1990.

EUCAST - EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. EUCAST E.DEF 7.3 December 2015 EUCAST antifungal MIC method for yeasts. n. December, p. 1–21, 2015.

FANOS, V.; CATALDI, L. Amphotericin B-Induced Nephrotoxicity: A Review. **Journal of Chemotherapy**, v. 12, n. 6, p. 463–470, 18 jan. 2000.

FERNANDES, J. A. L. et al. Evolution and application of inteins in *Candida* species: A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. OCT, p. 1–15, 10 out. 2016.

FERNANDES, O. F. et al. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 1, p. 75–78, fev. 2000.

FIRACATIVE, C. et al. The status of cryptococcosis in latin America. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, 5 abr. 2018.

FISHER, M. C. et al. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science (New York, N.Y.)**, v. 360, n. 6390, p. 739–742, 18 maio 2018.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 838–840, mar. 1999.

FU, M. S. et al. *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 6, p. e1007144, 15 jun. 2018.

GANGOPADHYAY, J. P.; JIANG, S.-Q.; PAULUS, H. An in vitro screening system for protein splicing inhibitors based on green fluorescent protein as an indicator. **Analytical chemistry**, v. 75, n. 10, p. 2456–62, 15 maio 2003.

GARCIA GARCES, H.; CORDEIRO, R. T.; BAGAGLI, E. PRP8 intein in dermatophytes: Evolution and species identification. **Medical Mycology**, v. 56, n. January, p. 1–13, 1 ago. 2017.

GASSMANN, M. et al. Quantifying Western blots: Pitfalls of densitometry. **Electrophoresis**, v. 30, n. 11, p. 1845–1855, 1 jun. 2009.

GHOSH, I.; SUN, L.; XU, M. Q. Zinc Inhibition of Protein trans-Splicing and Identification of Regions Essential for Splicing and Association of a Split Intein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 26, p. 24051–24058, 29 jun. 2001.

GIETZ, R. D.; WOODS, R. A. **Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method**. [s.l.] Elsevier, 2002. v. 350

GOGARTEN, J. P. et al. Inteins: Structure, Function, and Evolution. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 263–287, 28 jan. 2002.

GOGARTEN, J. P.; HILARIO, E. Inteins, introns, and homing endonucleases: Recent revelations about the life cycle of parasitic genetic elements. **BMC Evolutionary Biology**, v. 6, p. 94, 2006.

GRAINGER, R. J.; BEGGS, J. D. Prp8 protein: At the heart of the spliceosome. **Rna**, v. 11, n. 5, p. 533–557, 1 maio 2005.

GREEN, C. M.; NOVIKOVA, O.; BELFORT, M. The dynamic intein landscape of eukaryotes. **Mobile DNA**, v. 9, n. 1, p. 4, 2018.

HAGEN, F. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 16–48, 1 maio 2015.

HAGEN, F. et al. Importance of Resolving Fungal Nomenclature: the Case of Multiple Pathogenic Species in the *Cryptococcus* Genus. **mSphere**, v. 2, n. 4, p. e00238-17, 2017.

HEIDEBRECHT, F. et al. Improved semiquantitative Western blot technique with increased quantification range. **Journal of Immunological Methods**, v. 345, n. 1–2, p. 40–48, 30 jun. 2009.

HENRY, P. **Methods and compositions for specific inhibition of protein splicing by small molecules, and use in the treatment of tuberculosis and other conditions.** **PCT Int. Appl.**, 24 jan. 2006. Disponível em: <<https://lens.org/175-474-494-170-780>>. Acesso em: 22 out. 2018

HIRATA, R. et al. **Molecular structure of a gene, VMA1, encoding the catalytic subunit of H⁺-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*** **Journal of Biological Chemistry**. [s.l.] ASBMB, 1990. Disponível em: <<http://www.jbc.org/>>. Acesso em: 3 set. 2018.

IDNURM, A.; LIN, X. Rising to the challenge of multiple *Cryptococcus* species and the diseases they cause. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 1–6, maio 2015.

JEON, H. et al. Cell-Based Biosensors Based on Intein-Mediated Protein Engineering for Detection of Biologically Active Signaling Molecules. **MASSACHUSETTS INST OF TECHNOLOGY on August**, v. 8, p. acs.analchem.8b01481, 3 ago. 2018.

JESSICA C SONG. Hepatotoxicity of antifungal agents. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 6, n. 6, p. 170–177, 1 fev. 2005.

KANO, R. et al. Multi-azole-resistant strains of *Cryptococcus neoformans* var.

grubii isolated from a FLZ-resistant strain by culturing in medium containing voriconazole. **Medical Mycology**, v. 55, n. 8, p. 877–882, 1 nov. 2017.

KELLEY, D. S. et al. Mycobacterial DnaB helicase intein as oxidative stress sensor. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 4363, 19 dez. 2018.

KIDD, S. E. et al. Cryptococcus gattii dispersal mechanisms, British Columbia, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 51–57, jan. 2007.

KING, N. L. et al. Analysis of the Saccharomyces cerevisiae proteome with PeptideAtlas. **Genome Biology**, v. 7, n. 11, p. R106, 2006.

KÖHLER, J. R.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. The spectrum of fungi that infects humans. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 1, p. a019273, 1 jan. 2015.

KON, A. S. et al. Consenso em criptococose - 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 524–544, 2008.

KOUFOPANOU, V.; BURT, A. Degeneration and domestication of a selfish gene in yeast: Molecular evolution versus site-directed mutagenesis. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 7, p. 1535–1538, jul. 2005.

KOZEL, T. R.; GOTSCHLICH, E. C. The capsule of cryptococcus neoformans passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 129, n. 4, p. 1675–80, 1 out. 1982.

KOZUBOWSKI, L.; LEE, S. C.; HEITMAN, J. Signalling pathways in the pathogenesis of Cryptococcus. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 370–380, mar. 2009.

KWON-CHUNG, K. J. et al. The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **mSphere**, v. 2, n. 1, p. e00357-16, 22 fev. 2017.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Epidemiologic differences between the two varieties of Cryptococcus neoformans. **American Journal of Epidemiology**, v. 120, n. 1, p. 123–130, jul. 1984.

KWON-CHUNG, K. J.; EDMAN, J. C.; WICKES, B. L. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 2, p. 602–605, fev. 1991.

KWON-CHUNG, K. J.; RHODES, J. C. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 51, n. 1, p. 218–23, 1 jan. 1986.

KWONCHUNG, K. J.; EDMAN, J. C.; WICKES, B. L. **Genetic Association of Mating Types and Virulence in *Cryptococcus-Neoformans*** **Infection and Immunity**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC257671/pdf/iai00026-0294.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2018.

LACAZ, C. S. et al. [No Title Available]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p. 297–298, out. 2002.

LENGELER, K. B. et al. Mating-type locus of *Cryptococcus neoformans*: A step in the evolution of sex chromosomes. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 5, p. 704–718, out. 2002.

LENNON, C. W.; BELFORT, M. **Inteins** **Current Biology**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0960-9822%2817%2930016-7>>. Acesso em: 3 set. 2018.

LENNON, C. W.; STANGER, M.; BELFORT, M. Protein splicing of a recombinase intein induced by ssDNA and DNA damage. **Genes and Development**, v. 30, n. 24, p. 2663–2668, 2016.

LEV, S. et al. Phospholipase C of *Cryptococcus neoformans* regulates homeostasis and virulence by providing inositol trisphosphate as a substrate for Arg1 kinase. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 4, p. 1245–1255, 1 abr. 2013.

LIN, X.; HEITMAN, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 69–105, 2006.

LIU, X.-Q. Protein-Splicing Intein: Genetic Mobility, Origin, And Evolution. **Annual Review of Genetics**, v. 34, n. 1, p. 61–76, jan. 2000.

LIU, X. Q.; YANG, J. Prp8 intein in fungal pathogens: Target for potential

antifungal drugs. **FEBS Letters**, v. 572, n. 1–3, p. 46–50, 13 ago. 2004.

LU, P. et al. Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 117–124, 2007.

MACDOUGALL, L. et al. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 42–50, jan. 2007.

MAJOR, J. Challenges and opportunities in high throughput screening: Implications for new technologies. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 3, n. 1, p. 13–17, 2 fev. 1998.

MATTHEWS-KING, A. **Deaths from fungal infections exceeding malaria, say researchers in new drug resistance warning**. Disponível em: <<https://www.independent.co.uk/news/health/fungus-infection-drug-resistance-blood-sepsis-crop-blight-nhs-breast-cancer-malaria-a8356726.html>>. Acesso em: 15 jun. 2018.

MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: From environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 106–117, 21 fev. 2016.

MEYER, W. et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - A pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v. 20, n. 8, p. 1790–1799, 1 jan. 1999.

MEYER, W. et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 189–195, fev. 2003.

MILLS, K. V.; PAULUS, H. Reversible Inhibition of Protein Splicing by Zinc Ion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 14, p. 10832–10838, 6 abr. 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE et al. **Ministério Da Saúde Secretaria De**

Políticas De Saúde Coordenação Nacional De Dst E Aids Política Nacional De Dst/Aids Princípios, Diretrizes E Estratégias. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd03_17.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE et al. Vigilância e Epidemiológica Da Criptococose Brasília 2012. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação geral de doenças transmissíveis, unidade de vigilância das doenças de transmissão respiratória e imunopreveníveis.**, p. 1–18, 2012.

MONIER, A. et al. Gene invasion in distant eukaryotic lineages: Discovery of mutually exclusive genetic elements reveals marine biodiversity. **ISME Journal**, v. 7, n. 9, p. 1764–1774, set. 2013.

MORTIMER, R. K.; JOHNSTON, J. R. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. **Genetics**, v. 113, n. 1, p. 35–43, maio 1986.

NAGARAJ, N. et al. System-wide Perturbation Analysis with Nearly Complete Coverage of the Yeast Proteome by Single-shot Ultra HPLC Runs on a Bench Top Orbitrap. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 3, p. M111.013722, mar. 2012.

NAGASAKI, K. et al. Algal viruses with distinct intraspecies host specificities include identical intein elements. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 3599–3607, 2005.

NICASTRI, M. C. et al. Internal disulfide bond acts as a switch for intein activity. **Biochemistry**, v. 52, n. 34, p. 5920–5927, 27 ago. 2013.

NIELSEN, K.; KWON-CHUNG, K. J. A Role for Mating in Cryptococcal Virulence. In: **Cryptococcus**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2011. p. 167–174.

NOREN, C. J.; WANG, J.; PERLER, F. B. Dissecting the Chemistry of Protein Splicing and Its Applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 39, n. 3, p. 450–466, 2000.

NOVIKOVA, O. et al. Intein clustering suggests functional importance in

different domains of life. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 3, p. 783–799, mar. 2016.

NOVIKOVA, O.; TOPILINA, N.; BELFORT, M. Enigmatic distribution, evolution, and function of Inteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 21, p. 14490–14497, 23 maio 2014.

OHKUSU, M. et al. Serotype, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 44, n. 6, p. 299–302, dez. 2002.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **Aids**, v. 23, n. 4, p. 525–530, 2009.

PAULUS, H. Inteins as targets for potential antimycobacterial drugs. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 8, p. s1157–s1165, 1 set. 2003.

PAULUS, H. Protein splicing inhibitors as a new class of antimycobacterial agents. **Drugs of the Future**, v. 32, n. 11, p. 973–984, 2007.

PAVANKUMAR, T. Inteins: Localized Distribution, Gene Regulation, and Protein Engineering for Biological Applications. **Microorganisms**, v. 6, n. 1, p. 19, 28 fev. 2018.

PERFECT, J. R. et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 3, p. 291–322, 1 fev. 2010.

PERFECT, J. R.; BICANIC, T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 49–54, maio 2015.

PERFECT, J. R.; COX, G. M. **Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*** Drug Resistance Updates. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3319253&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 ago. 2018.

PERLER, F. B. et al. Protein splicing elements: Inteins and exteins - a definition of terms and recommended nomenclature. **Nucleic Acids Research**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=523631&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 jun. 2015.

PERLER, F. B. InBase: the Intein Database. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 383–384, 1 jan. 2002.

PICOTTI, P. et al. A complete mass-spectrometric map of the yeast proteome applied to quantitative trait analysis. **Nature**, v. 494, n. 7436, p. 266–270, 2013.

PINDER, J. B.; MCQUAID, M. E.; DOBSON, M. J. Deficient Sumoylation of Yeast 2-Micron Plasmid Proteins Rep1 and Rep2 Associated with Their Loss from the Plasmid-Partitioning Locus and Impaired Plasmid Inheritance. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e60384, 28 jan. 2013.

POLLOCK, A. Q.; WARD, L. M. A hemagglutination test for cryptococcosis. **The American Journal of Medicine**, v. 32, n. 1, p. 6–16, 1 jan. 1962.

Protein Splicing Inhibitors | Working Group for New TB Drugs. Disponível em: <<https://www.newtbdrugs.org/pipeline/compound/protein-splicing-inhibitors>>. Acesso em: 22 out. 2018.

PRANDINI, T. H. R. et al. Analysis of inteins in the *Candida parapsilosis* complex for simple and accurate species identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 9, p. 2830–2836, 1 set. 2013.

QI, S. et al. An electrochemical immunosensor based on pristine graphene for rapid determination of ractopamine. **Chemical Physics Letters**, v. 685, p. 146–150, 7 maio 2017.

RAJASEKHARAN, S. K. et al. Species-specific detection of *Candida tropicalis* using evolutionary conserved intein DNA sequences. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 378–383, maio 2018.

RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v.

17, n. 8, p. 873–881, 1 ago. 2017.

RODRIGUES, M. L. Neglected disease, neglected populations: The fight against cryptococcus and cryptococcosis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, 16 abr. 2018.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. EUCAST definitive document EDef 7.1: Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 4, p. 398–405, 1 abr. 2008.

ROSE, M.; GRISAFI, P.; BOTSTEIN, D. Structure and function of the yeast URA3 gene: expression in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 29, n. 1–2, p. 113–124, 1 jul. 1984.

ROSSI, E. DE; AÍNSA, J. A.; RICCARDI, G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: An unresolved question. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 36–52, 1 jan. 2006.

ROTHSTEIN, R. **Information regarding the provenance of *Saccharomyces cerevisiae* strain W303**. Disponível em:

<<http://wiki.yeastgenome.org/index.php/CommunityW303.html>>. Acesso em: 23 jul. 2015.

ROTHSTEIN, R. J. A genetic fine structure analysis of the suppressor 3 locus in *saccharomyces*. **Genetics**, v. 85, n. 1, p. 55–64, jan. 1977.

ROTHSTEIN, R. J. One-Step Gene Disruption in Yeast. **Methods in Enzymology**, v. 101, n. C, p. 202–211, jan. 1983.

ROTHSTEIN, R. J.; ESPOSITO, R. E.; ESPOSITO, M. S. The effect of ochre suppression on meiosis and ascospore formation in *saccharomyces*. **Genetics**, v. 85, n. 1, p. 35–54, jan. 1977.

ROTHSTEIN, R. J.; SHERMAN, F. Genes affecting the expression of cytochrome c in yeast: genetic mapping and genetic interactions. **Genetics**, v. 94, n. 9, p. 871–889, abr. 1980a.

ROTHSTEIN, R. J.; SHERMAN, F. Dependence on mating type for the over-

production of iso-2-cytochrome c in the yeast mutant CYC7-H2. **Genetics**, v. 94, n. 9, p. 891–898, abr. 1980b.

ROY, A.; EXINGER, F.; LOSSON, R. cis- and trans-acting regulatory elements of the yeast URA3 promoter. . out. 1990, p. 5257–5270.

SÁ-CORREIA, I. et al. Drug:H⁺ antiporters in chemical stress response in yeast. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 22–31, 1 jan. 2009.

SANTOS-GANDELMAN, J.; RODRIGUES, M. L.; MACHADO SILVA, A. Future perspectives for cryptococcosis treatment. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, p. 1–10, 7 ago. 2018.

SCHUELER, F. W. Perspectives in Drug Therapy. In: [s.l: s.n.]. p. 221–222.

SERIKAWA, K. A. et al. The Transcriptome and Its Translation during Recovery from Cell Cycle Arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 2, n. 3, p. 191–204, 7 mar. 2003.

SHERMAN, F. et al. Mutants of yeast defective in iso-1-cytochrome c. **Genetics**, v. 77, n. 2, p. 255–84, jun. 1974.

SHIH, C. K. et al. A dominant trifluoperazine resistance gene from *Saccharomyces cerevisiae* has homology with F₀F₁ ATP synthase and confers calcium-sensitive growth. **Molecular and cellular biology**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=363536&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3 set. 2018.

SINGH, A. et al. Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 4, n. 3, p. 220–233, 2013.

SINK, R. et al. False Positives in the Early Stages of Drug Discovery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 34, p. 4231–4255, 2010.

SMITH, K. D. et al. Increased antifungal drug resistance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7197–7204, 1 dez. 2015.

SOMCHIT, N. et al. Hepatotoxicity induced by antifungal drugs itraconazole and fluconazole in rats: A comparative in vivo study. **Human and Experimental Toxicology**, v. 23, n. 11, p. 519–525, 1 nov. 2004.

SPITZER, S. G.; SPITZER, E. D. Characterization of the CNRE-1 family of repetitive DNA elements in *Cryptococcus neoformans*. **Gene**, v. 144, n. 1, p. 103–106, 24 jun. 1994.

STAGLJAR, I. **Development of SIMPL, a novel protein-protein interaction assay based on split intein for biomedical research**. Disponível em: <<https://www.genomecanada.ca/en/development-simpl-novel-protein-protein-interaction-assay-based-split-intein-biomedical-research>>. Acesso em: 9 ago. 2018.

STOP NEGLECTING FUNGI. Stop neglecting fungi. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 17120, 25 jul. 2017.

SZOSTAK, J. W.; BLACKBURN, E. H. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. **Cell**, v. 29, n. 1, p. 245–255, maio 1982.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 1 dez. 2013.

THEODORO, R. C. et al. PRP8 intein in Ajellomycetaceae family pathogens: Sequence analysis, splicing evaluation and homing endonuclease activity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 2, p. 80–91, fev. 2011.

THEODORO, R. C.; BAGAGLI, E. Inteins in pathogenic fungi: A phylogenetic tool and perspectives for therapeutic applications. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 497–504, maio 2009.

THOMAS, B. J.; ROTHSTEIN, R. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. **Cell**, v. 56, n. 4, p. 619–630, 24 fev. 1989.

TIPHINE, M.; LETSCHER-BRU, V.; HERBRECHT, R. Amphotericin B and its new formulations: Pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. **Transplant Infectious Disease**, v. 1, n. 4, p. 273–283, dez. 1999.

TISHLER, M. Molecular Modification in Modern Drug Research, **AMERICAN CHEMICAL SOCIETY**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>. Acesso em: 23 out. 2018.

TOPILINA, N. I. et al. Post-translational environmental switch of RadA activity by extein-intein interactions in protein splicing. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 13, p. 6631–6648, 27 jul. 2015a.

TOPILINA, N. I. et al. SufB intein of *Mycobacterium tuberculosis* as a sensor for oxidative and nitrosative stresses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 33, p. 10348–10353, 18 ago. 2015b.

TOPILINA, N. I.; MILLS, K. V. Recent advances in in vivo applications of intein-mediated protein splicing. **Mobile DNA**, v. 5, n. 1, p. 5, 2014.

VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. DNA probe for strain typing of *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Microbiol**, v. 30, n. 11, p. 2960–2967, nov. 1992.

VISWESWARAIAH, J.; DAUTEL, M.; SATTLEGGER, E. Generating highly concentrated yeast whole cell extract using low-cost equipment. **Nature Protocol Exchange**, p. 1–5, 2011.

WANG, J. L. et al. Systematic review and meta-analysis of the tolerability and hepatotoxicity of antifungals in empirical and definitive therapy for invasive fungal infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2409–2419, 1 jun. 2010.

WANG, M. et al. Version 4.0 of PaxDb: Protein abundance data, integrated across model organisms, tissues, and cell-lines. **Proteomics**, v. 15, n. 18, p. 3163–3168, 1 set. 2015.

WHO. **WHO | Fact Sheet: World Malaria Day 2016**. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-day-2016/en/>>. Acesso em: 16 ago. 2018.

WHO. **Diarrhoeal disease**. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>>. Acesso em: 16 ago. 2018.

WHO. **Tuberculosis**. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact->

sheets/detail/tuberculosis>. Acesso em: 16 ago. 2018.

WILSON, D. E.; BENNETT, J. E.; BAILEY, J. W. Serologic Grouping of *Cryptococcus neoformans*. **Experimental Biology and Medicine**, v. 127, n. 3, p. 820–823, 1 mar. 1968.

WOOLLASTON, V. **Fungal diseases now cause more deaths than malaria and tuberculosis**. Disponível em: <<http://www.dailymail.co.uk/sciencetech/article-2912033/Could-fungus-big-killer-Experts-warn-fungal-diseases-cause-deaths-malaria-tuberculosis.html>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

WU, H.; HU, Z.; LIU, X.-Q. Protein trans-splicing by a split intein encoded in a split DnaE gene of *Synechocystis* sp. PCC6803. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 16, p. 9226–9231, 4 ago. 1998.

XU, M. Q.; EVANS, T. C. Intein-mediated ligation and cyclization of expressed proteins. **Methods**, v. 24, n. 3, p. 257–277, jul. 2001.

YANG, D. J.; RANKIN, G. O. Nephrotoxicity of antifungal agents. **Adverse Drug Reaction. Acute Poisoning. Review**, v. 4, n. 1, p. 37–47, 1985.

ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. **Genetics**, v. 171, n. 4, p. 1571–1581, dez. 2005.

ZARAGOZA, O. et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2043–2057, 1 out. 2008.

ZHANG, L. et al. Cisplatin inhibits protein splicing, suggesting inteins as therapeutic targets in mycobacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 2, p. 1277–1282, 14 jan. 2011.

ZIMNIAK, L. et al. **The cDNA sequence of the 69-kDa subunit of the carrot vacuolar H⁺-ATPase. Homology to the beta-chain of F₀F₁-ATPases.** **Journal of Biological Chemistry**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/263/19/9102.full.pdf>>. Acesso em: 3 set. 2018.

Apêndices

APÊNDICE A – Alinhamento da Ura3 nativa e das construções pRCO1, pRCO2 e pRCT1.

```

Ura3  -----MSKATYKERAATHPSVAAKLFNIMHEKQTNLCASLDVRTTKELLELVEAL
CO1   MGSHHHHHMSKATYKERAATHPSVAAKLFNIMHEKQTNLCASLDVRTTKELLELVEAL
CO2   MGSHHHHHMSKATYKERAATHPSVAAKLFNIMHEKQTNLCASLDVRTTKELLELVEAL
CT1   MGSHHHHHMSKATYKERAATHPSVAAKLFNIMHEKQTNLCASLDVRTTKELLELVEAL

```

```

Ura3  GPKICLLKTHVDILTDFSMEGTVKPLKALSAYNFLLFEDRKFADIGNTVKLOYSAGVYR
CO1   GPKICLLKTHVDILTDFSMEGTVKPLKALSAYNFLLFEDRKFADIGNTVKLOYSAGVYR
CO2   GPKICLLKTHVDILTDFSMEGTVKPLKALSAYNFLLFEDRKFADIGNTVKLOYSAGVYR
CT1   GPKICLLKTHVDILTDFSMEGTVKPLKALSAYNFLLFEDRKFADIGNTVKLOYSAGVYR

```

```

Ura3  IAE-----
CO1   IAE-----
CO2   IAEKA-----
CT1   IAEKACLQNGTRLLRADGSEVLVEDVQEGDQLLGPDGTSRTASKIVRGEERLYRIKTHEG

```

```

Ura3  -----
CO1   -----
CO2   -----
CT1   LEDLVCTHNHILSMYKERSGSERAHSPSADLSLTDSSHERVDVTVDDFVRLPQQEQQKYQL

```

```

Ura3  -----W
CO1   -----W
CO2   -----SGW
CT1   FRSTASVRHERPFTSKLDTLLRINSIELEDEPTKWSGFVVDKDSLRLRHDYLVLHNSGW

```

```

Ura3  ADITNAHGTVVGPVIVSGLKQAAEEVTKEPRGLLMLAELSCKGSLSTGEYTKGTVDIAKSD
CO1   ADITNAHGTVVGPVIVSGLKQAAEEVTKEPRGLLMLAELSCKGSLSTGEYTKGTVDIAKSD
CO2   ADITNAHGTVVGPVIVSGLKQAAEEVTKEPRGLLMLAELSCKGSLSTGEYTKGTVDIAKSD
CT1   ADITNAHGTVVGPVIVSGLKQAAEEVTKEPRGLLMLAELSCKGSLSTGEYTKGTVDIAKSD

```

```

Ura3  KDFVIGFIAQRDMGGRDEGYDWLIMTPGVGLDDKGDALGQQYRTVDDVVSTGSDIIIVGR
CO1   KDFVIGFIAQRDMGGRDEGYDWLIMTPGVGLDDKGDALGQQYRTVDDVVSTGSDIIIVGR
CO2   KDFVIGFIAQRDMGGRDEGYDWLIMTPGVGLDDKGDALGQQYRTVDDVVSTGSDIIIVGR
CT1   KDFVIGFIAQRDMGGRDEGYDWLIMTPGVGLDDKGDALGQQYRTVDDVVSTGSDIIIVGR

```

```

Ura3  GLFAKGRDAKVEGERYRKAGWEAYLRRCGQON
CO1   GLFAKGRDAKVEGERYRKAGWEAYLRRCGQON
CO2   GLFAKGRDAKVEGERYRKAGWEAYLRRCGQON
CT1   GLFAKGRDAKVEGERYRKAGWEAYLRRCGQON

```

APÊNDICE B – Alinhamento da Ura3 nativa e das construções pRCO1, pRCO3, pRCT2 e pRCT2Mut1.

```

Ura3      -----MSKATYKERAATHPSPVAAKLFNIMHEKQTNLCASLDVRTTKELLELVEAL
CO1      MGSHHHHHHMSKATYKERAATHPSPVAAKLFNIMHEKQTNLCASLDVRTTKELLELVEAL
CO3      MGSHHHHHHMSKATYKERAATHPSPVAAKLFNIMHEKQTNLCASLDVRTTKELLELVEAL
CT2      MGSHHHHHHMSKATYKERAATHPSPVAAKLFNIMHEKQTNLCASLDVRTTKELLELVEAL
CT2Mut1  MGSHHHHHHMSKATYKERAATHPSPVAAKLFNIMHEKQTNLCASLDVRTTKELLELVEAL

```

```

Ura3      GPKICLLKTHVDILTDFSMEGTVKPLKALSAKYNFLLFEDRKFADIGNTVKLQYSAGVYR
CO1      GPKICLLKTHVDILTDFSMEGTVKPLKALSAKYNFLLFEDRKFADIGNTVKLQYSAGVYR
CO3      GPKICLLKTHVDILTDFSMEGTVKPLKALSAKYNFLLFEDRKFADIGNTVKLQYSAGVYR
CT2      GPKICLLKTHVDILTDFSMEGTVKPLKALSAKYNFLLFEDRKFADIGNTVKLQYSAGVYR
CT2Mut1  GPKICLLKTHVDILTDFSMEGTVKPLKALSAKYNFLLFEDRKFADIGNTVKLQYSAGVYR

```

```

Ura3      IAEWADITNAHGVVGGPIVSGLKQAAEEVTKEPRGLLMLAELSCKG-----
CO1      IAEWADITNAHGVVGGPIVSGLKQAAEEVTKEPRGLLMLAELSCKG-----
CO3      IAEWADITNAHGVVGGPIVSGLKQAAEEVTKEPRGLLMLAELSCKA-----
CT2      IAEWADITNAHGVVGGPIVSGLKQAAEEVTKEPRGLLMLAELSCKACLQNGTRLLRADGS
CT2Mut1  IAEWADITNAHGVVGGPIVSGLKQAAEEVTKEPRGLLMLAELSCKAALQNGTRLLRADGS

```

```

Ura3      -----
CO1      -----
CO3      -----
CT2      EVLVEDVQEGDQLLGGPDGTSRTASKIVRGEERLYRIKTHEGLEDLVCTHNNHILSMYKERS
CT2Mut1  EVLVEDVQEGDQLLGGPDGTSRTASKIVRGEERLYRIKTHEGLEDLVCTHNNHILSMYKERS

```

```

Ura3      -----
CO1      -----
CO3      -----
CT2      GSERAHSPSADLSLTDSSHERVDVTVDDFVRLPQQEQQKYQLFRSTASVRHERPFTSKLDT
CT2Mut1  GSERAHSPSADLSLTDSSHERVDVTVDDFVRLPQQEQQKYQLFRSTASVRHERPFTSKLDT

```

```

Ura3      -----S-LSTGEYTKGTVDIAKSDKDF
CO1      -----S-LSTGEYTKGTVDIAKSDKDF
CO3      -----SGLSTGEYTKGTVDIAKSDKDF
CT2      TLLRINSIELEDEPTKWSGFVVDKDSLYLRHDYLVLHN SGLSTGEYTKGTVDIAKSDKDF
CT2Mut1  TLLRINSIELEDEPTKWSGFVVDKDSLYLRHDYLVLHN SGLSTGEYTKGTVDIAKSDKDF

```

```

Ura3      VIGFIAQRDMGGRDEGYDWLIMTPGVGLDDKGDALGQQYRTVDDVVSTGSDIIIVGRGLF
CO1      VIGFIAQRDMGGRDEGYDWLIMTPGVGLDDKGDALGQQYRTVDDVVSTGSDIIIVGRGLF
CO3      VIGFIAQRDMGGRDEGYDWLIMTPGVGLDDKGDALGQQYRTVDDVVSTGSDIIIVGRGLF
CT2      VIGFIAQRDMGGRDEGYDWLIMTPGVGLDDKGDALGQQYRTVDDVVSTGSDIIIVGRGLF
CT2Mut1  VIGFIAQRDMGGRDEGYDWLIMTPGVGLDDKGDALGQQYRTVDDVVSTGSDIIIVGRGLF

```

```

Ura3      AKGRDAKVEGERYRKAGWEAYLRRCGQQN
CO1      AKGRDAKVEGERYRKAGWEAYLRRCGQQN
CO3      AKGRDAKVEGERYRKAGWEAYLRRCGQQN
CT2      AKGRDAKVEGERYRKAGWEAYLRRCGQQN
CT2Mut1  AKGRDAKVEGERYRKAGWEAYLRRCGQQN

```

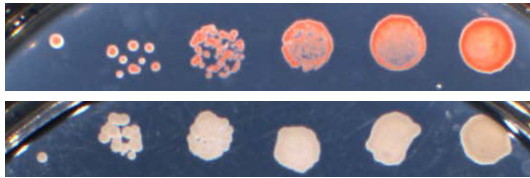
APÊNDICE C – Teste de sensibilidade à temperatura para todas as colônias utilizadas neste trabalho.

Apresentação dos dados sumarizados na [Tabela 3](#) e na [Figura 17](#).

W303-pR313 #1

25°C

SC -His



SC -His -Ura



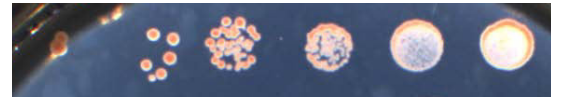
5-FoA



- []

+ []

37°C



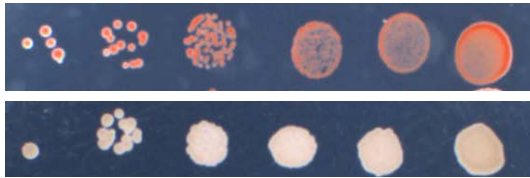
- []

+ []

W303-pR313 #2

25°C

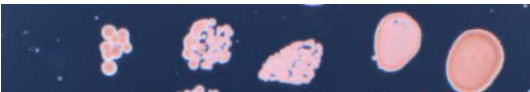
SC -His



SC -His -Ura



5-FoA



- []

+ []

37°C



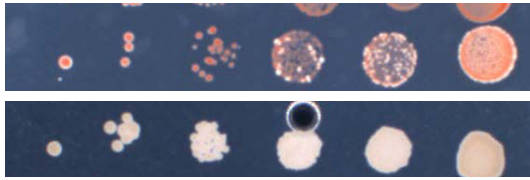
- []

+ []

W303-pR313 #3

25°C

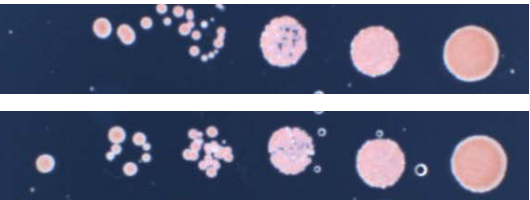
SC -His



SC -His -Ura



5-FoA



- []

+ []

37°C



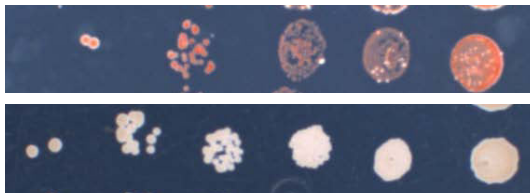
- []

+ []

W303-pR313 #4

25°C

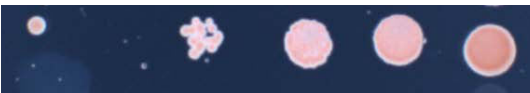
SC -His



SC -His -Ura



5-FoA



- []

+ []

37°C



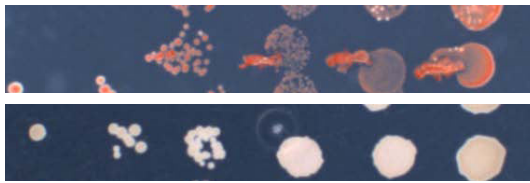
- []

+ []

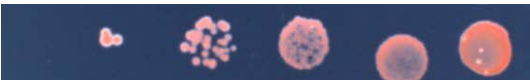
W303-pRCO1 #1

25°C

SC -His



SC -His -Ura



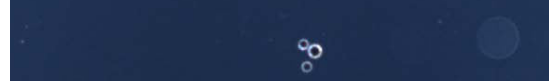
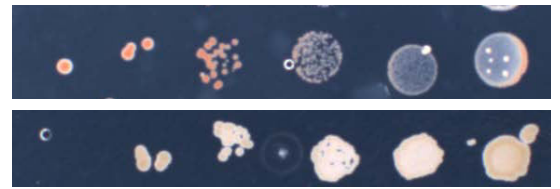
5-FoA



- []

+ []

37°C



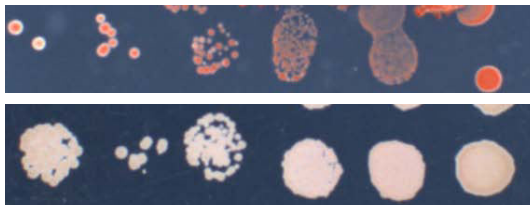
- []

+ []

W303-pRCO1 #2

25°C

SC -His



SC -His -Ura



5-FoA



- []

+ []

37°C



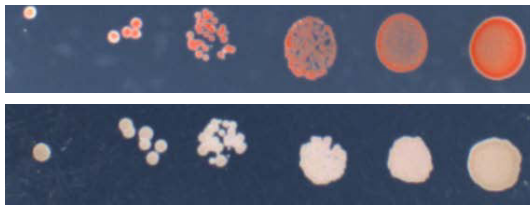
- []

+ []

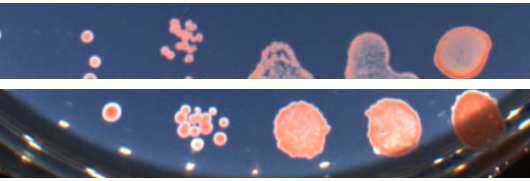
W303-pRCO1 #3

25°C

SC -His



SC -His -Ura



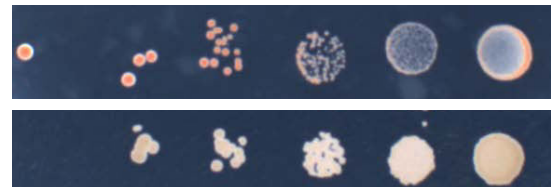
5-FoA



- []

+ []

37°C



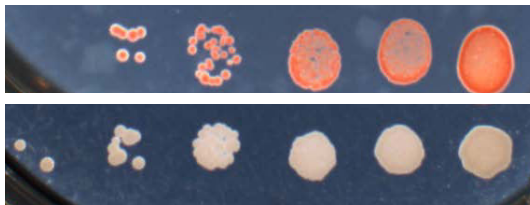
- []

+ []

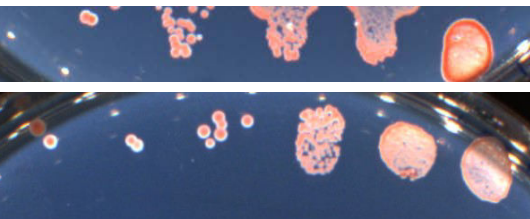
W303-pRCO1 #4

25°C

SC -His



SC -His -Ura



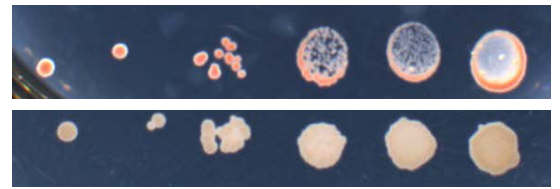
5-FoA



- []

+ []

37°C



- []

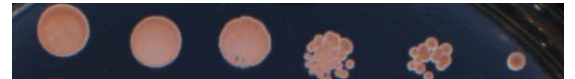
+ []

W303-pRCO2 #1

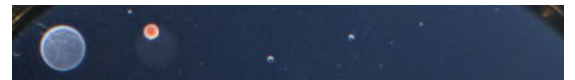
25°C

37°C

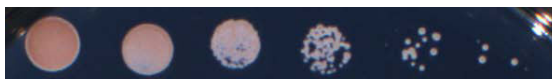
SC -His



SC -His -Ura



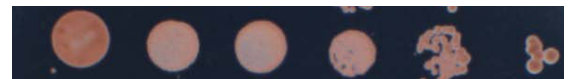
5-FoA



SC -His



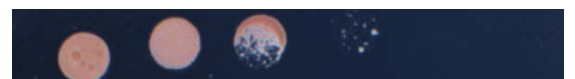
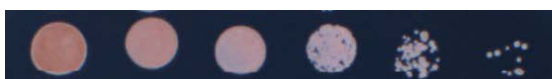
W303-pRCO2 #2



SC -His -Ura



5-FoA



+ []

- []

+ []

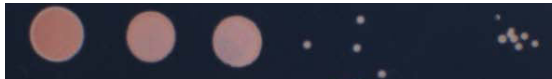
- []

W303-pRCO2 #3

25°C

37°C

SC -His



SC -His -Ura

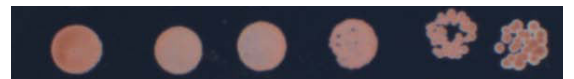
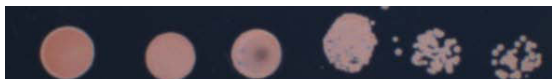


5-FoA

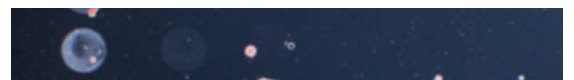


W303-pRCO2 #4

SC -His



SC -His -Ura



5-FoA



+ []

- []

+ []

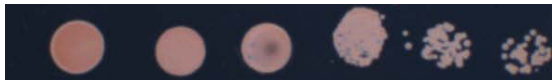
- []

W303-pRCO3 #1

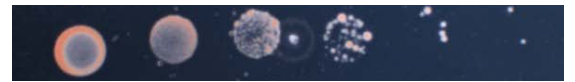
25°C

37°C

SC -His



SC -His -Ura



5-FoA



W303-pRCO3 #2

SC -His



SC -His -Ura



5-FoA



+ []

- []

+ []

- []

W303-pRCO3 #3

25°C

37°C

SC -His



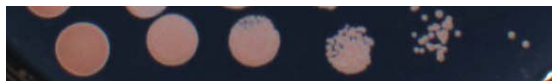
SC -His -Ura



5-FoA

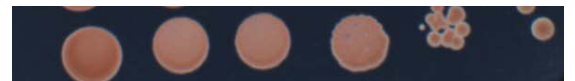
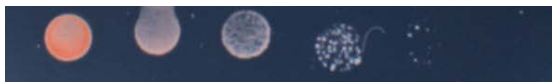


SC -His

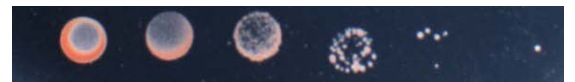


W303-pRCO3 #4

SC -His -Ura



5-FoA



+ []

- []

+ []

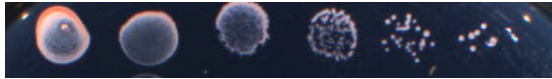
- []

W303-pRCT1 #1

25°C

37°C

SC -His



SC -His -Ura



5-FoA



SC -His



SC -His -Ura



5-FoA



+ []

- []

+ []

- []

W303-pRCT1 #2

W303-pRCT1 #3

25°C

37°C

SC -His



SC -His -Ura



5-FoA



SC -His



SC -His -Ura



5-FoA



+ []

- []

+ []

- []

W303-pRCT1 #4

W303-pRCT2 #1

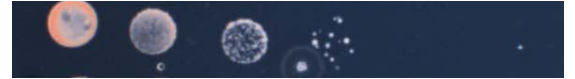
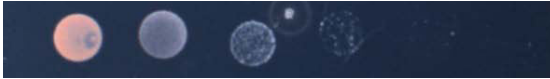
25°C

37°C

SC -His



SC -His -Ura



5-FoA



W303-pRCT2 #2

SC -His



SC -His -Ura



5-FoA



+ []

- []

+ []

- []

W303-pRCT2 #3

25°C

37°C

SC -His



SC -His -Ura



5-FoA

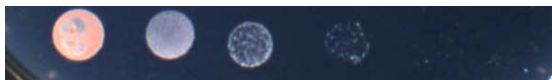


W303-pRCT2 #4

SC -His



SC -His -Ura



5-FoA



+ []

- []

+ []

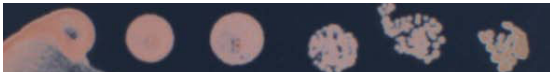
- []

W303-pRCT2Mut1 #1

25°C

37°C

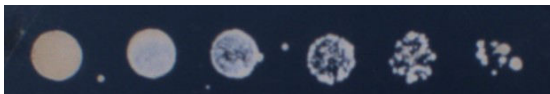
SC -His



SC -His -Ura

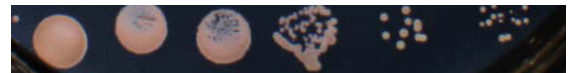


5-FoA



W303-pRCT2Mut1 #2

SC -His



SC -His -Ura



5-FoA



+ []

- []

+ []

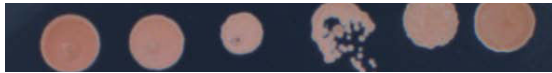
- []

W303-pRCT2Mut1 #3

25°C

37°C

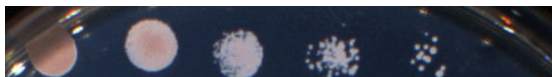
SC -His



SC -His -Ura



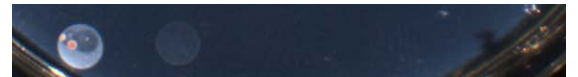
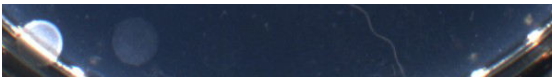
5-FoA



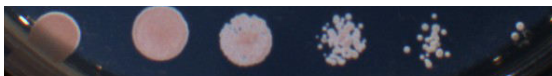
SC -His



SC -His -Ura



5-FoA



+ []

- []


+ []

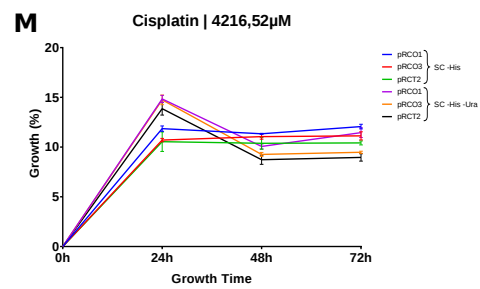
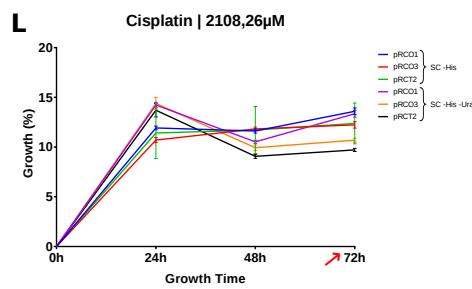
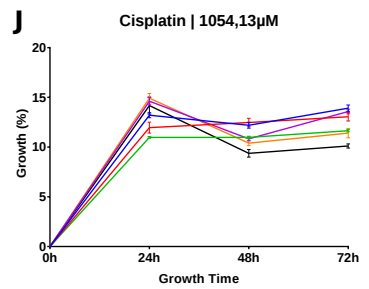
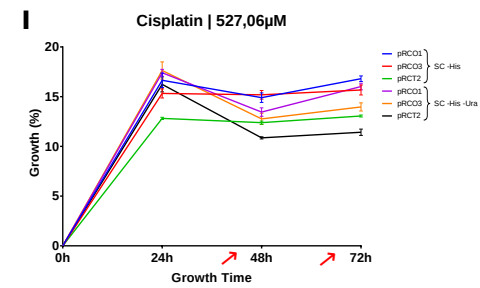
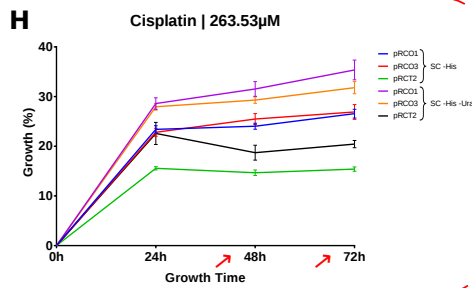
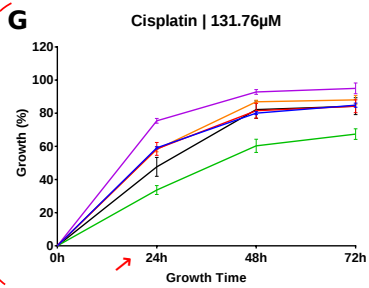
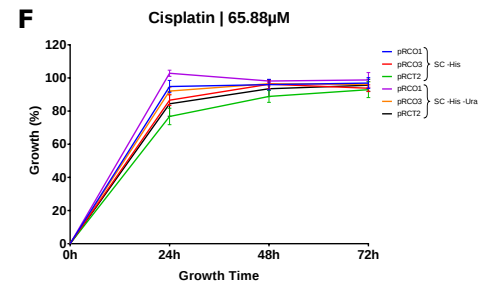
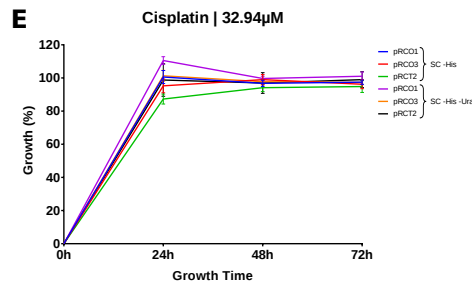
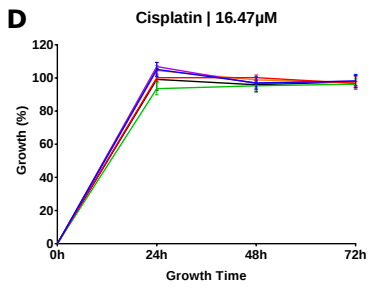
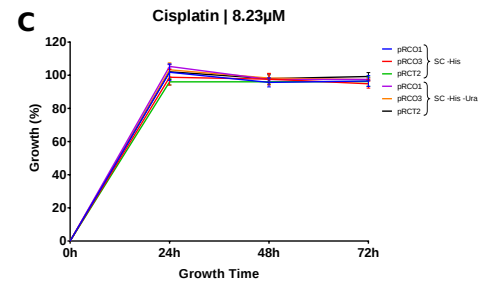
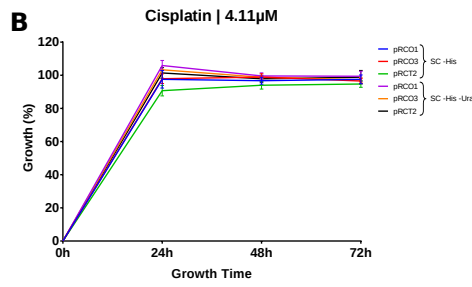
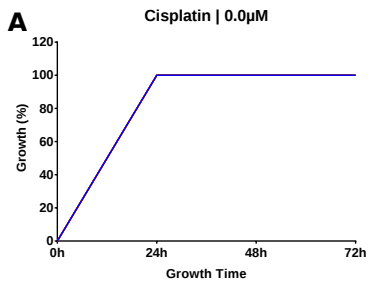
- []

APÊNDICE D – Crescimento ao longo do tempo, com estratificação por concentração de Cisplatina.

Para identificar concentrações de cisplatina que podem atuar inibindo o *splicing* do *intein* da construção pRCT2, gerou-se gráficos estratificados apenas por concentração, sendo possível comparar o crescimento das células transformadas com as diferentes construções ao longo do tempo (Apêndice D). Nestes gráficos é possível observar que as concentrações de cisplatina de 131,76 μM e de 263,53 μM foram as que apresentaram maiores diferenças entre as construções. Sendo que pRCT2 nos meios SC –His e SC –His –Ura aparentemente tiveram seu crescimento mais afetado. Os pontos de maior diferença entre as construções foram a 131,76 μM em 24 h e a 263,53 μM em 48h. Concentrações abaixo desta faixa não inibem as leveduras de forma diferenciada e concentrações acima acabam sendo tóxicas demais para todas. Para melhor análise do crescimento nestas concentrações, plotou-se *boxplots* destes dados e aferiu-se suas significâncias estatísticas (Figura 18).

Legenda:

No eixo X tem-se o tempo (em horas) do momento de aferição do crescimento e no eixo Y tem-se o percentual de crescimento das células que está normalizado pelo crescimento máximo apresentado nos poços sem adição da droga. Todas as construções foram testadas em três meios e tiveram crescimento de modo a corroborar os resultados do teste de sensibilidade à temperatura (Figura 17), porém, para facilitar a visualização, apenas as células transformadas com o pRCO1, pRCO3 e pRCT2 são mostradas. O retângulo em vermelho mostra as duas concentrações nas quais observam-se diferenças estatísticas de crescimento entre os meios SC –His e SC –His –Ura. As setas em vermelho () apontam para os pontos onde a Cisplatina atua de modo mais específico no pRCT2.



APÊNDICE E – Sumarização do p -value dos crescimento das leveduras nos diferentes meios apresentados na Figura 19.

p -values da [Figura 18](#).

Concentração	Tempo	Dataset #1	Dataset #2	p -value
131,76 μ M	24 h	pRCO1 (SC -His)	pRCO3 (SC -His)	7.87E-01
		pRCO1 (SC -His)	pRCT2 (SC -His)	9.10E-05 *
		pRCO3 (SC -His)	pRCT2 (SC -His)	8.21E-04 *
		pRCO1 (SC -His -Ura)	pRCO3 (SC -His -Ura)	1.35E-04 *
		pRCO1 (SC -His -Ura)	pRCT2 (SC -His -Ura)	1.21E-03 *
		pRCO3 (SC -His -Ura)	pRCT2 (SC -His -Ura)	3.64E-02
		pRCO1 (SC -His)	pRCO1 (SC -His -Ura)	5.76E-05 *
		pRCO3 (SC -His)	pRCO3 (SC -His -Ura)	9.08E-01
		pRCT2 (SC -His)	pRCT2 (SC -His -Ura)	1.83E-02
		SC -His	SC -His -Ura	1.13E-01
263,53 μ M	48 h	pRCO1 (SC -His)	pRCO3 (SC -His)	1.18E-01
		pRCO1 (SC -His)	pRCT2 (SC -His)	3.94E-05 *
		pRCO3 (SC -His)	pRCT2 (SC -His)	1.10E-04 *
		pRCO1 (SC -His -Ura)	pRCO3 (SC -His -Ura)	7.56E-02
		pRCO1 (SC -His -Ura)	pRCT2 (SC -His -Ura)	4.60E-04 *
		pRCO3 (SC -His -Ura)	pRCT2 (SC -His -Ura)	3.54E-04 *
		pRCO1 (SC -His)	pRCO1 (SC -His -Ura)	1.28E-03 *
		pRCO3 (SC -His)	pRCO3 (SC -His -Ura)	6.61E-03
		pRCT2 (SC -His)	pRCT2 (SC -His -Ura)	1.17E-02
		SC -His	SC -His -Ura	7.02E-02

Nota: Os sinais de asterisco (*) significam que o valor de p -value obtido entre os *datasets* correspondentes foi menor que 0,005.

APÊNDICE F – Concentração de todas as amostras das extrações proteicas quantificadas pelo método de Bradford; além do detalhamento dos meios utilizados para crescimentos das células e OD₆₀₀ das culturas.

Amostra (#)	Descrição	Meio de Crescimento	OD ₆₀₀ da Cultura	Concentração (µg/µL)	Uso	Tipo de Extração
1	W303-pRS313	SC -his	0.80	3.73	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
2	W303-pRS313	SC -his	-old	2.90	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
3	W303-pRS313	SC -his	1.05	7.04	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
4	W303-pRS313	SC -his	> 0,8	4.27	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
5	W303-pRC01	SC -his	1.00	5.25	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
6	W303-pRC01	SC -his	0.80	2.74	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
7	W303-pRC01	SC -his -ura	-old	4.31	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
8	W303-pRC01	SC -his	> 0,8	4.42	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
9	W303-pRC01	SC -his -ura	> 0,8	5.99	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
10	W303-pRC01	SC -his	0.90	4.69	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
11	W303-pRC01	SC -his -ura	0.60	4.50	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
12	W303-pRC02	SC -his	1.20	3.88	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
13	W303-pRC02	SC -his	-old	4.34	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
14	W303-pRC02	SC -his	0.80	3.73	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
15	W303-pRC02	SC -his	> 0,8	5.06	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
16	W303-pRC03	SC -his -ura	-old	4.31	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
17	W303-pRC03	SC -his -ura	> 0,8	3.53	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
18	W303-pRC03	SC -his -ura	0.80	5.77	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
19	W303-pRC03	SC -his	> 0,8	5.77	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
20	W303-pRC03	SC -his	0.80	3.92	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
21	W303-pRCT1	SC -his	0.95	4.34	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
22	W303-pRCT1	SC -his	-old	4.08	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
23	W303-pRCT1	SC -his	> 0,8	4.04	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
24	W303-pRCT2 #2	SC -his	~6,0	5.10	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
25	W303-pRCT2	SC -his	0.71	5.33	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
26	W303-pRCT2	SC -his -ura	-old	5.99	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
27	W303-pRCT2	SC -his -ura	0.24	4.42	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
28	W303-pRCT2	SC -his -ura	2.50	5.73	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
29	W303-pRCT2	SC -his	> 0,8	6.75	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
30	W303-pRCT2 #1	SC -his	~6,0	9.63	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
31	W303-pRCT2	SC -his -ura	0.43	3.84	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
32	W303-pRCMut	SC -his	0.85	3.47	SDS-Page + CBB e/ou InVision	● e ●
33	W303-pRS313	SC -his	1.40	0.90	Western Blot	●
34	W303-pRC01	SC -his -ura	1.10	0.80	Western Blot	●
35	W303-pRC02	SC -his	0.80	1.00	Western Blot	●
36	W303-pRC03	SC -his -ura	1.00	1.20	Western Blot	●
37	W303-pRCT1	SC -his	1.30	1.00	Western Blot	●
38	W303-pRCT2	SC -his	0.80	0.70	Western Blot	●
39	W303-pRCT2	SC -his -ura	0.90	1.00	Western Blot	●
40	W303-pRCMut	SC -his	1.30	1.00	Western Blot	●

Fonte: autoria própria.

Nota: Os círculos vermelhos (●) significam que foi feita extração utilizando lise alcalina; já os círculos verdes (●) significam que utilizou-se de lise mecânica.

Anexos

ANEXO A – Coautoria em artigo não-diretamente relacionado à esta dissertação

Participação como coautor em artigo oriundo da dissertação de mestrado do M.e. Felipe Emmanuel do Espírito Santo Gomes, intitulado “Polymorphism in Mitochondrial Group I Introns among *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Genotypes and Its Association with Drug Susceptibility” e publicado na periódico *Fronteiers in Microbiology* em 06 de Fevereiro de 2018. Esta revista tem fator de impacto de 4,019 e, portanto, o comitê de ciências biológicas II (CBII) a classifica como A2.



Polymorphism in Mitochondrial Group I Introns among *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Genotypes and Its Association with Drug Susceptibility

Felipe E. E. S. Gomes^{1,2}, Thales D. Arantes^{1,2}, José A. L. Fernandes², Leonardo C. Ferreira^{1,2}, Héctor Romero³, Sandra M. G. Bosco⁴, Maria T. B. Oliveira⁵, Gilda M. B. Del Negro⁶ and Raquel C. Theodoro^{2*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Hector Mora Montes,
Universidad de Guanajuato, Mexico

Reviewed by:

Marilene Henning Vainstein,
Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

Elizabeth R. Ballou,
University of Birmingham,
United Kingdom

*Correspondence:

Raquel C. Theodoro
raquel.ctheodoro@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Fungi and Their Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 23 October 2017

Accepted: 12 January 2018

Published: 06 February 2018

Citation:

Gomes FEES, Arantes TD, Fernandes JAL, Ferreira LC, Romero H, Bosco SMG, Oliveira MTB, Del Negro GMB and Theodoro RC (2018) Polymorphism in Mitochondrial Group I Introns among *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Genotypes and Its Association with Drug Susceptibility. *Front. Microbiol.* 9:86. doi: 10.3389/fmicb.2018.00086

¹ Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil, ² Institute of Tropical Medicine of Rio Grande do Norte, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil, ³ Laboratorio de Organizacion y Evolucion del Genoma/Unidad de Genómica Evolutiva, Departamento de Ecología y Evolución, Facultad de Ciencias/CURE, Universidad de la República, Maldonado, Uruguay, ⁴ Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, São Paulo, Brazil, ⁵ Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil, ⁶ Institute of Tropical Medicine of São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Cryptococcosis, one of the most important systemic mycosis in the world, is caused by different genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, which differ in their ecology, epidemiology, and antifungal susceptibility. Therefore, the search for new molecular markers for genotyping, pathogenicity and drug susceptibility is necessary. Group I introns fulfill the requisites for such task because (i) they are polymorphic sequences; (ii) their self-splicing is inhibited by some drugs; and (iii) their correct splicing under parasitic conditions is indispensable for pathogen survival. Here, we investigated the presence of group I introns in the mitochondrial *LSU rRNA* gene in 77 *Cryptococcus* isolates and its possible relation to drug susceptibility. Sequencing revealed two new introns in the *LSU rRNA* gene. All the introns showed high sequence similarity to other mitochondrial introns from distinct fungi, supporting the hypothesis of an ancient non-allelic invasion. Intron presence was statistically associated with those genotypes reported to be less pathogenic ($p < 0.001$). Further virulence assays are needed to confirm this finding. In addition, *in vitro* antifungal tests indicated that the presence of *LSU rRNA* introns may influence the minimum inhibitory concentration (MIC) of amphotericin B and 5-fluorocytosine. These findings point to group I introns in the mitochondrial genome of *Cryptococcus* as potential molecular markers for antifungal resistance, as well as therapeutic targets.

Keywords: group I introns, mtDNA, *LSU*, *Cryptococcus* genotypes, antifungal susceptibility, 5-fluorocytosine, homing endonuclease