

TAYNÁ CRISTINA DOS SANTOS

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES *VELVET VEA* E *VELC* NO FUNGO  
PATOGENICO HUMANO *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

BRASÍLIA, 2014.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE

TAYNÁ CRISTINA DOS SANTOS

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES *VELVET VEA* E *VELC* NO FUNGO  
PATOGENICO HUMANO *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências e Tecnologias em Saúde pelo Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Fernandes Matos

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Sueli Soares Felipe

Brasília

2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE

Tayná Cristina dos Santos

**Caracterização funcional dos genes *velvet VEA* e *VELC* no fungo patogênico humano *Cryptococcus neoformans***

Brasília, 28 de Abril de 2014.

**Banca Examinadora:**

Orientadora: Larissa Fernandes Matos - UnB

Examinadores: Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares - UnB

Patricia Albuquerque de Andrade Nicola - UnB

Suplente: Janice Lisboa De Marco - UnB

*Dedico este trabalho à minha família, por terem  
respeitado a minha escolha e por me  
apoiarem nos momentos difíceis.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pois sem Ele não teria conseguido chegar aonde cheguei;

À minha família, que soube respeitar a minha escolha e por me apoiar nos momentos difíceis. Em especial os meus avós, pela paciência, pela compreensão que foram essenciais nos últimos dois anos e meio;

À minha mãe, que foi meu ombro amigo nos momentos em que quis desistir, e que, na medida do possível, me incentivou e me ajudou nos piores momentos;

Aos meus tios, pelos conselhos e incentivos;

Ao meu namorado, Gabriel Pasquarelli, que foi mais que amigo e confidente. Que esteve ao meu lado nos piores momentos, mas mesmo assim me apoiou, incentivou e continua o fazendo, mesmo estando em outro país. Sem ele, este trabalho não teria sido concluído;

Aos meus amigos, por compreenderem que a minha ausência era devido a um compromisso maior e que, apesar da ausência, sempre me consideraram, apoiaram e incentivaram;

À Universidade de Brasília, pela estrutura e conhecimento compartilhado, que foi essencial para a execução deste trabalho;

À minha orientadora Larissa Fernandes Matos, pela paciência ao me ensinar e pela confiança em mim depositada;

À minha co-orientadora Maria Sueli Felipe, pelas sugestões, confiança e por disponibilizar as instalações de seu laboratório;

Aos colegas e amigos que fiz no laboratório de Biologia Molecular, pelas conversas, incentivos, ajuda e direcionamento. Em especial à Luisa Peconick que foi paciente e esteve disposta a discutir métodos, sanar dúvidas desde o momento em que entrei

no LAB4; ao Hugo C. Paes que me ajudou MUITO no último ano de mestrado, principalmente com os testes de sobrevivência em macrófagos e com o duplo-híbrido. Aos colegas do LAB4 e membros de grupo, pela companhia agradável, pelas brincadeiras, pelas conversas, ajuda, desabafos e conselhos que me fizeram crescer muito, tanto como pessoa, quanto como profissional;

Às Doutoradas Érika S. Kioshima e Ana Karina R. Abadio pela amizade, conselhos e ajuda antes mesmo do meu ingresso na Pós-Graduação;

Pelas caronas que tive nesses dois anos de mestrado, elas me ajudaram muito mesmo!

Aos colegas de 'corredor' por sempre estarem à disposição, pela ajuda (principalmente quando ficamos sem fluxo no LAB4), conselhos sugestões;

À D. Ivonildes e D. Fátima por me ajudarem sempre que precisei;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias da Saúde pela oportunidade e estrutura oferecidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade e apoio financeiro.

Em suma, a todos que contribuíram para a conclusão deste trabalho. Meu MUITÍSSIMO OBRIGADA!!

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Cryptococcus neoformans: Classificação e fatores de virulência</i>	1
1.2	<i>Fases morfológicas de C. neoformans</i>	5
1.3	<i>As proteínas velvet em outros fungos</i>	9
1.4	<i>Interações entre os velvets</i>	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>21</b>
3.1	<i>Linhagens e meios de cultura utilizados</i>	21
3.1.1	Linhagens celulares	21
3.1.2	Meios de cultura	21
3.1.2.1	Meio YPD ( <i>Yeast Peptone Dextrose</i> ): para manutenção de <i>C. neoformans</i>	21
3.1.2.2	Meios de cultura para testes fenotípicos	21
a)	Meios contendo <i>Congo Red</i> , Cloreto de sódio (NaCl), Cloreto de potássio (KCl), Sorbitol, Cafeína, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).	21
b)	Meio L-DOPA Ágar	21
c)	Meio DMEM + MOPS – Meio indutor de cápsula	22
d)	Christensen's Urea Agar – Meio para teste de urease	22
e)	Meio emulsão gema de ovo – Meio para teste de fosfolipase	22
3.1.2.3	Meios de cultura indutores de acasalamento em <i>C. neoformans</i>	23
a)	Meio Agar Filament	23
b)	Meio comercial Murashige and Skoog (MS)	23
3.1.2.4	Meios de cultura com diferentes concentrações de Nitrogênio	23
a)	Meio SLAD ( <i>Synthetic Low Ammonium Dextrose</i> )	23
b)	Meio SMAD ( <i>Synthetic Medium Ammonium Dextrose</i> )	23
c)	Meio SHAD ( <i>Synthetic High Ammonium Dextrose</i> )	23
3.1.2.6	Meios utilizados para o Duplo-Híbrido (Y2H)	24
a)	Meio YPDA	24
b)	Meio SD	24

c) Meio SD/-Tryptofano	24
d) Meio SD/-Leucina	25
e) Meio SD/ <i>Double Drop Out (DDO)</i> : Sem Tryptofano e Leucina	25
f) Meio SD/ <i>Quadruple Drop Out (QDO)</i>	25
3.2 <i>Análise in silico do gene VEA e VELC de C. neoformans utilizando o banco genômico disponível</i>	25
3.3 <i>Avaliação da função gênica de VEA e VELC através de deleção gênica no modelo C. neoformans.</i>	28
3.3.1 Construção do cassete de deleção dos genes <i>VEA</i> e <i>VELC</i> de <i>C. neoformans</i>	28
3.3.2 Transformação de <i>C. neoformans</i> por biobalística para obtenção dos mutantes <i>veAΔ</i> e <i>velCΔ</i>	35
3.3.3 Extração do DNA genômico de <i>C. neoformans</i> ( <i>Smash and Grab</i> )	37
3.3.4 Confirmação da deleção de <i>VEA</i> e <i>VELC</i>	37
3.3.5 Confirmação dos mutantes <i>veAαΔ</i> , <i>veAαΔ</i> , <i>velCaΔ</i> e <i>velCαΔ</i> por <i>Southern Blot</i>	39
3.3.5.1 Digestão do DNA genômico e <i>Southern Blot</i>	40
3.4 <i>Reconstituição do locus de VEA e VELC</i>	43
3.5 <i>Avaliação fenotípica in vitro dos mutantes veAΔ e velCΔ</i>	45
3.5.1 Estresse térmico	46
3.5.2 Síntese de melanina	46
3.5.3 Produção de cápsula	46
3.5.4 Produção de urease	46
3.5.5 Produção de fosfolipase	46
3.5.6 Integridade da parede celular	46
3.5.7 Estresse oxidativo	47
3.5.8 Estresse osmótico	47
3.5.9 Teste de resistência à luz UV	47
3.5.10 Crescimento em meios com diferentes concentrações de nitrogênio	47
3.5.11 Teste de Fusão	48
3.5.12 Acasalamento	48
3.5.13 Análise microscópica das hifas dos cruzamentos de selvagens e mutantes de <i>VEA</i> e <i>VELC</i>	48



3.5.13.1	Coloração das hifas dos cruzamentos de selvagens e mutantes de <i>VEA</i> e <i>VELC</i>	49
3.6	<i>Avaliação da Sobrevivência in vitro dos mutantes veA<math>\Delta</math> e velC<math>\Delta</math></i>	49
3.7	<i>Análise da interação dos velvets de C. neoformans–Duplo-Híbrido</i>	51
3.7.1	Extração de RNA e síntese do cDNA	51
3.7.2	Desenho de oligonucleotídeos para duplo-híbrido	52
3.7.3	Amplificação dos cDNAs dos <i>velvets</i> de <i>C. neoformans</i>	53
3.7.4	Clonagem dos genes de interesse, transformação e recuperação do plasmídeo	54
3.7.5	PCR do sistema de recombinação e PCR de colônia dos plasmídeos de <i>VELC</i> (presas)	57
3.7.6	Confirmação da clonagem por meio de PCR dos plasmídeos	58
3.7.7	Transformação das leveduras de <i>S. cerevisiae</i>	58
3.7.8	Acasalamento de <i>S. cerevisiae</i> para duplo-híbrido	59
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>60</b>
4.1	<i>Análise in silico do gene VEA e VELC de C. neoformans utilizando o banco genômico disponível</i>	60
4.2	<i>Avaliação da função gênica de VEA e VELC através de deleção gênica no modelo C. neoformans</i>	66
4.3	<i>Obtenção dos reconstituídos veA<math>\Delta</math>::VEA e velC<math>\Delta</math>::VELC</i>	73
4.4	<i>Avaliação fenotípica in vitro de veA<math>\Delta</math> e velC<math>\Delta</math> e seus respectivos reconstituídos</i>	78
4.4.1	Estresse térmico	78
4.4.2	Síntese de melanina	79
4.4.3	Produção de cápsula	79
4.4.4	Produção de urease	81
4.4.5	Produção de fosfolipase	82
4.4.6	Integridade da parede celular	83
4.4.7	Estresse oxidativo	86
4.4.8	Estresse osmótico	87
4.4.10	Crescimento em diferentes concentrações de Nitrogênio	90

4.4.11	Teste de Fusão	91
4.4.12	Acasalamento	92
4.5	<i>Análise microscópica das hifas dos cruzamentos de selvagens e mutantes de VEA e VELC</i>	104
4.6	<i>Sobrevivência in vitro dos mutantes veA<math>\Delta</math> e velC<math>\Delta</math></i>	107
4.7	<i>Análise da interação dos velvets de C. neoformans– Duplo-Híbrido</i>	109
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>114</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>121</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática da evolução do complexo <i>Cryptococcus</i> .	1
<b>Figura 2</b> - Ciclo infeccioso de <i>Cryptococcus</i> (ambiente e hospedeiro).	3
<b>Figura 3</b> - Fases do ciclo de vida de <i>C. neoformans</i> .	6
<b>Figura 4</b> - Arquitetura das proteínas <i>velvet</i> , <i>VeA</i> , <i>VelB</i> , <i>VosA</i> e <i>VelC</i> , em <i>Aspergillus nidulans</i> .	10
<b>Figura 5</b> - Interações das proteínas <i>velvet</i> <i>VeA</i> , <i>VelB</i> e <i>VosA</i> em <i>A. nidulans</i> .	17
<b>Figura 6</b> - Representação da técnica de PCR <i>Double Joint</i> .	35
<b>Figura 7</b> - Mapas dos plasmídeos utilizados no ensaio de duplo-híbrido.	55
<b>Figura 8</b> - Esquema do funcionamento do teste de duplo-híbrido.	56
<b>Figura 9</b> - Alinhamento entre as sequências proteicas antiga e nova de <i>VEA</i> .	61
<b>Figura 10</b> - Cladograma esquemático do parentesco das proteínas <i>VeA</i> e <i>VelC</i> com os demais fungos.	62
<b>Figura 11</b> – Predição estrutural das proteínas <i>VeA</i> e <i>VelC</i> de <i>C. neoformans</i> .	63
<b>Figura 12</b> - Alinhamento múltiplo das sequências das proteínas <i>velvet</i> de <i>C. neoformans</i> .	65
<b>Figura 13</b> – Cladograma comparativo das proteínas <i>velvet</i> de <i>C. neoformans</i> incluindo as novas sequências encontradas após a atualização do banco de dados.	66
<b>Figura 14</b> - Confirmação dos produtos de PCR obtidos na primeira etapa da técnica de PCR <i>Double Joint</i> que consiste na obtenção dos fragmentos das marcas de seleção e dos fragmentos adjacentes ao gene alvo.	67
<b>Figura 15</b> - Confirmação dos produtos obtidos na segunda etapa da técnica de PCR <i>Double Joint</i> que consiste na fusão dos fragmentos adjacentes ao gene alvo com os fragmentos das marcas de seleção.	67
<b>Figura 16</b> - Esquema para a confirmação de deleção de <i>VEA</i> e <i>VELC</i> em <i>C. neoformans</i> .	68
<b>Figura 17</b> - PCR de confirmação 5' e 3' dos possíveis mutantes de <i>VEA</i> nos <i>MAT<math>\alpha</math></i> e <i>MAT<math>\beta</math></i> de <i>C. neoformans</i> .	69
<b>Figura 18</b> - PCR de confirmação 5' e 3' dos possíveis mutantes de <i>VELC</i> nos <i>MAT<math>\alpha</math></i> e <i>MAT<math>\beta</math></i> de <i>C. neoformans</i> .	70
<b>Figura 19</b> - Confirmação por <i>Southern Blot</i> da deleção de <i>VEA</i> nos mutantes confirmados por PCR.	71

<b>Figura 20</b> - Esquema da deleção parcial de <i>VEA</i> e estudo de restrição da sequência atualizada de <i>VEA</i> de <i>C. neoformans</i> .	72
<b>Figura 21</b> - Confirmação por <i>Southern Blot</i> da deleção de <i>VELC</i> nos mutantes confirmados por PCR.	73
<b>Figura 22</b> - Esquema da estratégia para obtenção dos fragmentos de reconstituição e eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de reconstituição de <i>VEA</i> e <i>VELC</i> .	74
<b>Figura 23</b> - Esquema representativo para a confirmação reconstituição do <i>locus</i> de <i>VEA</i> em <i>C. neoformans</i> e eletroforese de gel de agarose dos produtos obtidos de PCR obtidos por meio da amplificação das regiões 5' e 3' do <i>locus</i> de <i>VEA</i> em ambos os tipos sexuais.	75
<b>Figura 24</b> - Esquema representativo para a confirmação reconstituição do <i>locus</i> de <i>VELC</i> em <i>C. neoformans</i> e eletroforese de gel de agarose 0,8% dos produtos obtidos de PCR obtidos por meio da amplificação das regiões 5' e 3' do <i>locus</i> de <i>VELC</i> em ambos os tipos sexuais.	76
<b>Figura 25</b> - Crescimento das cepas selvagem, mutante e reconstituída nos meios com suas respectivas marcas de seleção.	77
<b>Figura 26</b> - Teste de estresse térmico em meio YPD em diferentes temperaturas.	78
<b>Figura 27</b> - Teste de produção de melanina.	79
<b>Figura 28</b> - Produção de cápsula.	80
<b>Figura 29</b> - Teste de atividade de urease em meio de Christensen.	81
<b>Figura 31</b> - Teste de estresse de parede utilizando diferentes estressores em diferentes temperaturas.	84
<b>Figura 32</b> - Ensaio de estresse oxidativo em meio YPD acrescido de 1 mM e 5 mM peróxido de hidrogênio.	87
<b>Figura 33</b> - Teste de estresse osmótico das linhagens selvagem, mutante e reconstituída dos genes <i>VEA</i> e <i>VELC</i> .	88
<b>Figura 34</b> - Teste resistência à luz UV.	89
<b>Figura 35</b> - Teste de crescimento dos selvagens, mutantes e reconstituídos de <i>VEA</i> e <i>VELC</i> em meios com diferentes concentrações de Nitrogênio.	90
<b>Figura 37</b> - Acasalamento entre as cepas selvagem, mutante e reconstituídas de <i>VEA</i> acompanhadas diariamente em meio Filament Agar por até 10 dias na ausência de luz.	93

<b>Figura 38</b> - Acasalamento entre as cepas selvagem, mutante e reconstituídas de <i>VEA</i> acompanhadas diariamente em meio MS por até 10 dias na ausência de luz.	94
<b>Figura 39</b> - Acasalamento entre as cepas selvagem, mutante e reconstituídas de <i>VEA</i> acompanhadas diariamente em meio SLAD por até 10 dias na ausência de luz.	95
<b>Figura 40</b> - Acasalamento entre as cepas selvagem, mutante e reconstituídas de <i>VEA</i> acompanhadas diariamente em meio SLAD por até 10 dias na presença de luz.	97
<b>Figura 41</b> - Acasalamento entre as cepas selvagem, mutante e reconstituídas de <i>VELC</i> acompanhadas diariamente em meio Filament por até 10 dias na ausência de luz branca.	98
<b>Figura 42</b> - Acasalamento entre as cepas selvagem, mutante e reconstituídas de <i>VELC</i> acompanhadas diariamente em meio MS por até 10 dias na ausência de luz branca.	99
<b>Figura 43</b> - Acasalamento entre as cepas selvagem, mutante e reconstituídas de <i>VELC</i> acompanhadas diariamente em meio SLAD por até 10 dias na ausência de luz branca.	100
<b>Figura 44</b> - Acasalamento entre as cepas selvagem, mutante e reconstituídas de <i>VELC</i> acompanhadas diariamente em meio SLAD por até 10 dias na presença de luz branca.	102
<b>Figura 45</b> - Microscopia em DIC da periferia dos cruzamentos de selvagens e mutantes de <i>VEA</i> e <i>VELC</i> .	105
<b>Figura 46</b> - Análise da morfologia das hifas por microscopia de fluorescência.	106
<b>Figura 47</b> - Ensaio de sobrevivência em macrófagos peritoniais murinos J774. A1.	108
<b>Figura 48</b> - Amplificação dos cDNAs dos <i>velvets</i> de <i>C. neoformans</i> .	109
<b>Figura 49</b> - Plasmídeos obtidos após a transformação e miniprep.	110
<b>Figura 50</b> - PCR de confirmação da clonagem dos insertos em seus respectivos plasmídeos.	111
<b>Figura 51</b> - PCR do sistema de recombinação de <i>VELC</i> e PCR de colônia.	111
<b>Figura 52</b> - Confirmação da clonagem por meio de PCR com oligonucleotídeo T7.	112

<b>Tabela 1</b> - Lista dos fenótipos conhecidos de <i>VEA</i> e <i>VELC</i> em diversos fungos. ND: Não descrito. (Continua).	14
<b>Tabela 1</b> - Lista dos fenótipos conhecidos de <i>VEA</i> e <i>VELC</i> em diversos fungos. ND: Não descrito. (Conclusão).	15
<b>Tabela 2</b> - Lista de micro-organismos utilizados para comparação de sequências proteicas de <i>VeA</i> . (Continua).	26
<b>Tabela 2</b> - Lista de micro-organismos utilizados para comparação de sequências proteicas de <i>VeA</i> . (Conclusão).	27
<b>Tabela 3</b> - Lista de micro-organismos utilizados para comparação de sequências proteicas de <i>Ve/C</i> .	27
<b>Tabela 4</b> - Oligonucleotídeos utilizados no estudo de <i>VEA</i> e <i>VELC</i> em <i>C.</i> <i>neoformans</i> (Continua).	28
<b>Tabela 4</b> - Oligonucleotídeos utilizados no estudo de <i>VEA</i> e <i>VELC</i> em <i>C.</i> <i>neoformans</i> (Continuação).	28
<b>Tabela 4</b> - Oligonucleotídeos utilizados no estudo de <i>VEA</i> e <i>VELC</i> em <i>C.</i> <i>neoformans</i> (Continuação).	30
<b>Tabela 4</b> - Oligonucleotídeos utilizados no estudo de <i>VEA</i> e <i>VELC</i> em <i>C.</i> <i>neoformans</i> (Conclusão).	31
<b>Tabela 5</b> - Atividade de fosfolipase.	82

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

°C – Graus Celsius

AMP – Monofosfato cíclico de adenosina

CFW – Calcoflúor White

CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio

DIC – Contraste Diferencial de Interferência

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetil Sulfóxido

GalXM – Galactoxilomanana

GXM – Glucuroxilomanana

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

*HPH* – Higromicina Fosfotransferase

Kb – Kilobases

M – Molar

Maa – Milhões de anos atrás

MAP – Proteína Ativada por Mitógeno

*NAT* – Nourseotricina Acetil Transferase

NES – Sinal de Exportação Nuclear

NLS – Sinal de Localização Nuclear

*ORF* - *Open Reading Frame*

pb – Pares de Bases

PBS – Tampão Fosfo-Salino

PCR – Reação de polimerização em cadeia

PEG – Polietilenoglicol

PLB – Fosfolipase B

RPM – Rotações por minuto

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

SNC – Sistema Nervoso Central

UFC – Unidade Formadora de Colônia

TAP – *Tandem affinity purification*

UV – Ultravioleta

*Y2H* – *Yeast Two Hybrid*

## RESUMO

O fungo basidiomiceto *Cryptococcus neoformans* se trata de um patógeno oportunista, que geralmente acomete pacientes imunodeprimidos ou imunossuprimidos, causando a criptococose. Esta doença é cosmopolita e pode ser fatal se não tratada. Os genes *velvet* *VEA* e *VELC* codificam uma família de proteínas conservadas em ascomicetos e basidiomicetos, tais proteínas foram descobertas em meados de 1960 em *Aspergillus nidulans*, onde foi descoberto o primeiro gene *velvet*, *VEA*. Os fenótipos apresentados por mutantes de *VEA* são os mais diversos nos fungos filamentosos nos quais esse gene foi estudado, sendo que os principais observados foram defeitos na parede celular e no desenvolvimento sexual, redução da produção de micotoxinas e da virulência. Assim, *VEA* é um fator transcricional conservado que regula diferentes respostas aos estímulos ambientais. Mais recentemente, foi descoberto o gene *VELC* e o mesmo foi recentemente caracterizado em *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus* e *Fusarium oxysporum*. Os fenótipos resultantes da deleção de *VELC* são sutis e indicam que o mesmo é um regulador positivo do desenvolvimento sexual. A análise *in silico* de *VEA* e *VELC* de *C. neoformans* revela que esses genes são conservados. Foi realizada a construção dos cassetes de deleção para cada um dos genes, que foram transformados separadamente em células haploides de KN99 $\alpha/\alpha$  por meio de biobalística para a obtenção dos mutantes *veA $\Delta$*  e *velC $\Delta$*  de *C. neoformans*. Os genes foram reconstituídos para a confirmação do fenótipo observado. Não foram observadas diferenças de *veA $\alpha\Delta$*  e *velC $\alpha\Delta$*  sobre os fatores de virulência clássicos de *C. neoformans* quando comparados com a cepa selvagem (KN99 $\alpha$ ), porém os mutantes *veA $\Delta$*  apresentaram o fenótipo de hiperfilamentação quando submetidos ao acasalamento e insensibilidade à luz branca nas mesmas condições. Entretanto, os mutantes *velC $\Delta$*  não apresentaram alteração no acasalamento, exceto, uma leve insensibilidade à luz branca nesta condição. A fim de verificar as interações entre as proteínas *velvets* de *C. neoformans*, experimentos de duplo-híbrido estão sendo conduzidos em *Saccharomyces cerevisiae* a fim de verificar as interações entre os *velvets* de *C. neoformans*. Os resultados obtidos indicam que *VEA* e *VELC* agem como reguladores negativos do desenvolvimento sexual em *C. neoformans* não afetando os principais fatores de virulência deste patógeno. Os dados deste trabalho são o início para o esclarecimento dos papéis de *VEA* e *VELC* na biologia de *C. neoformans*.



Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, proteínas velvet, VEA, VELC, sensoramento de luz, acasalamento.

## ABSTRACT

The basidiomycete fungus *Cryptococcus neoformans* is an opportunistic organism which commonly infects immunocompromised patients causing cryptococcosis. This is a cosmopolitan disease and can be fatal if untreated. *VEA* and *VELC* genes codify the conserved family of velvet proteins and this family is conserved in ascomycetes and basidiomycetes, such proteins were characterized in the mid 1960's in *Aspergillus nidulans*, when *VEA* was discovered. *VEA* null mutants phenotypes display defects in sexual development and decreased production of mycotoxins in the filamentous fungi in which this gene was studied. *VEA* null mutants show cell wall defects and reduced virulence, indicating that *VEA* is a conserved transcriptional factor that regulates many responses to environmental cues. More recently, *VELC* was characterized in *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus* and *Fusarium oxysporum*. The phenotypes of the *VELC* null mutants are subtle and indicate that this gene is a positive regulator of sexual development. In silico analysis shows that both genes are conserved in *C. neoformans*. Deletion cassettes were constructed for each gene and separately transformed in KN99 $\alpha/\alpha$  haploid yeasts to obtain *veA* $\Delta$  and *velC* $\Delta$  strains. Then, the strains were complemented with the wild-type gene to confirm the phenotype. No differences were found in *veA* $\alpha\Delta$  and *velC* $\alpha\Delta$  on classical virulence factors of *C. neoformans* when compared to the wild-type strain (KN99 $\alpha$ ), but the *veA* $\Delta$  mutants showed hyperfilamentation when mating was performed in the dark and insensitivity to white light when crossed. However, *velC* $\Delta$  crosses showed a slight insensitivity to white light. In order to identify the interactions among the *velvets* of *C. neoformans*, yeast two-hybrid assays are being conducted in *Saccharomyces cerevisiae* due to verify the protein-protein interactions between *C. neoformans* *velvet* proteins. The results indicate that *VEA* and *VELC* act as negative regulators of sexual development in *C. neoformans* not affecting the main virulence traits of this pathogen. Data from this work are beginning to clarify the roles of *VEA* and *VELC* on the biology of *C. neoformans*.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, *velvet* proteins, *VEA*, *VELC*, light sensing, mating.

## 1 INTRODUÇÃO

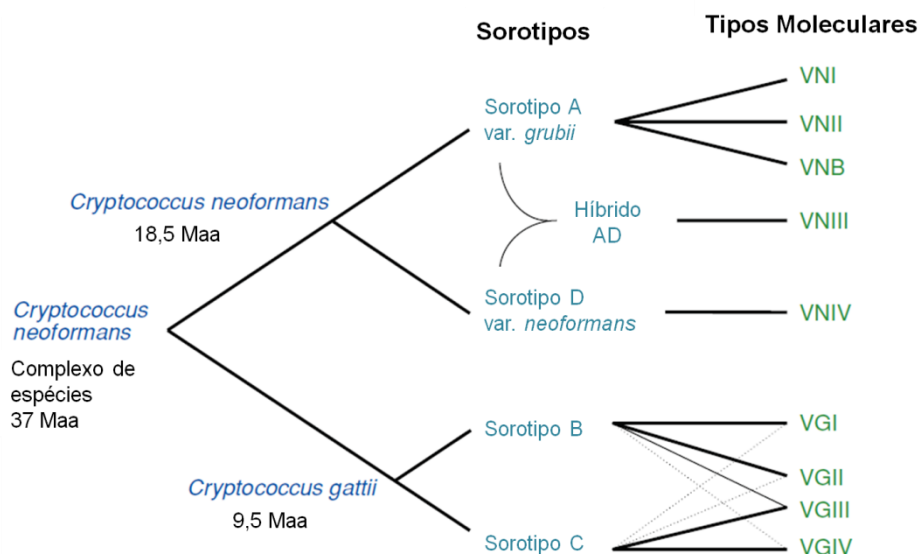
### 1.1 *Cryptococcus neoformans*: Classificação e fatores de virulência

O fungo patogênico humano *Cryptococcus neoformans* foi inicialmente descoberto em meados de 1894, por meio do isolamento deste fungo da tíbia de um paciente e pelo isolamento do mesmo em um suco de pêssago, ambos de forma independente (Idnurm *et al.*, 2005; Lin & Heitman, 2006).

Até a década de 50, achava-se que o gênero *Cryptococcus* se tratava de um gênero homogêneo, porém por meio de ensaios de aglutinação de antígenos capsulares as cepas foram classificadas em sorotipos A, B, C e D, sendo o sorotipo A correspondente a *C. neoformans* var. *grubii*, B e C correspondentes a *C. gattii* e finalmente sorotipo D correspondente ao *C. neoformans* var. *neoformans* (Evans, 1950; Meyer *et al.*, 2009).

Uma nova classificação foi sugerida em 2009 por Meyer e colaboradores baseando-se nos padrões moleculares nos quais o gênero *Cryptococcus* foi dividido em nove tipos moleculares por meio de sequenciamento multilocus, sendo o sorotipo A correspondente aos padrões VNI, VNII ou VNB, o sorotipo híbrido AD corresponde ao padrão molecular VNIII, os isolados do sorotipo D correspondem ao padrão VNIV. Enquanto os padrões VGI, VGII e VGIII correspondem ao sorotipo B. E o sorotipo C corresponde aos padrões VGIII ou VGIV, como demonstra a **Figura 1**.

**Figura 1** - Representação esquemática da evolução do complexo *Cryptococcus*. Os sorotipos conhecidos descendem de um ancestral comum que divergiu a 37 milhões de anos atrás (Maa) em *Cryptococcus neoformans* e a 18.5 maa em *C. gattii* duas subespécies.



Fonte: Adaptado de Lin & Heitman, 2006.

Em meados da década de 70, foram identificadas as formas sexuais (teleomórfas) de *C. neoformans* e *C. gattii*, as quais foram denominadas *Filobasidiella neoformans*, para os sorotipos A e D; e *Filobasidiella bacillispora* para os sorotipos B e C (Kwon-Chung, 1976a; Kwon-Chung, 1976b).

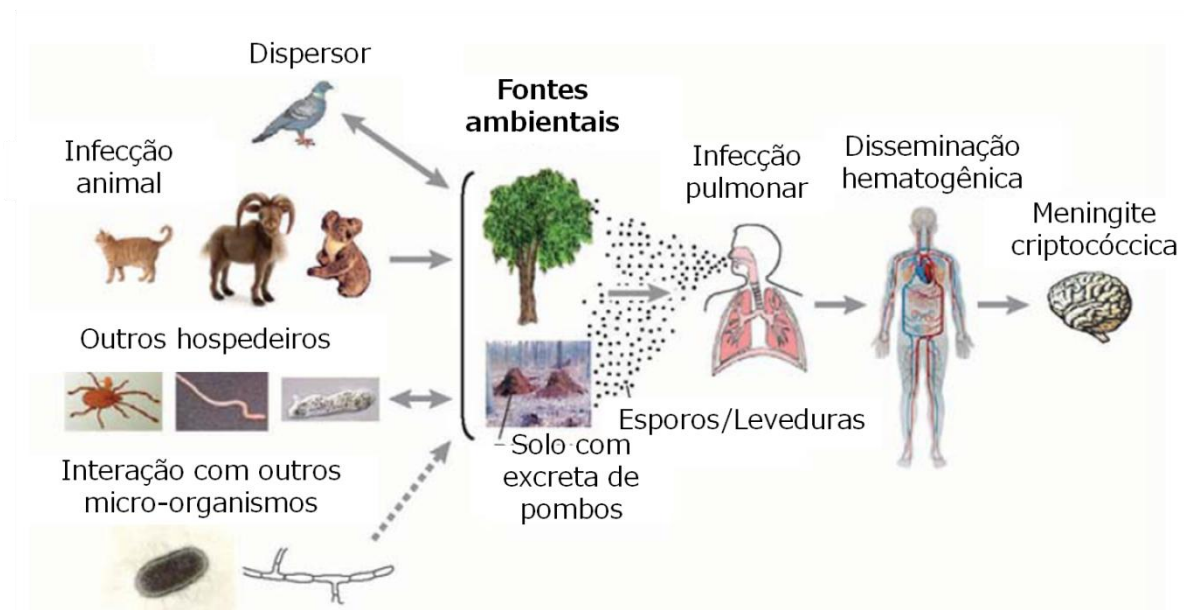
O *C. neoformans* e *C. gatti* são os agentes etiológicos da criptococose, doença que acomete principalmente pacientes imunodeprimidos ou imunossuprimidos. Tal doença é cosmopolita tendo incidência aproximada de mais de 900 mil casos por ano em pacientes HIV positivos, resultando em aproximadamente 600 mil mortes, sendo até mais fatal que a tuberculose na África Subsaariana (Park *et al.*, 2009).

No Brasil, entre os anos de 1998 a 2006, 125.633 pacientes morreram em decorrência de complicações associadas a AIDS, os quais 4,7% das mortes tiveram associação com micoses sistêmicas. Entre estas, criptococose teve a frequência de 50,9%, seguida pela candidíase (30,2%) e pela histoplasmose (10,1%) das mortes associadas a micoses sistêmicas (Prado *et al.*, 2009).

Os principais nichos ecológicos destes patógenos são as copas de árvores, excretas de pombos e também, no solo (Idnurm & Heitman, 2005). No Brasil, os isolados de ocos de árvores do gênero *Cassia*, *Ficus* e *Moquillea* foram identificados como sorotipos A e B por meio de identificação com o kit *Crypto Check latron RM-304*. Também foram identificados os mesmo sorotipos em restos de *Eucalyptus camaldulensis* (Nishikawa *et al.*, 2003).

A principal via de infecção ocorre por meio da inalação de propágulos fúngicos, tais como basidiósporos, clamidósporos e leveduras dissecadas que são facilmente aerolizadas do solo, excrementas de pombos e árvores (Idnurm & Heitman, 2005; Lin & Heitman, 2006; Velagapudi *et al.*, 2009). Após a inalação, a doença pode ficar latente ou se desenvolver, a depender do estado imunológico do paciente. No parênquima pulmonar, as leveduras inaladas são fagocitadas por macrófagos alveolares e em seguida pode ocorrer disseminação hematogênica, onde o fungo pode atingir qualquer órgão, inclusive o sistema nervoso central (SNC) pelo qual o *C. neoformans* possui tropismo (Hull & Heitman, 2002) (**Figura 2**).

**Figura 2** - Ciclo infeccioso de *Cryptococcus* (ambiente e hospedeiro). O fungo é capaz de sobreviver no solo, associado às excretas de aves (sendo o pombo um dos principais responsáveis por sua dispersão) ou outros animais, em árvores, ou ainda em hospedeiros animais como gatos, cabras e coalas. *C. neoformans* também é capaz de sobreviver em associação com predadores ambientais como insetos, minhocas e amebas, além de poder interagir com bactérias ou outros fungos. O fungo estabelece a infecção pulmonar em humanos através da inalação de seus esporos ou de células de levedura dissecadas. Quando o hospedeiro se torna imunocomprometido, o fungo é capaz de se reativar da forma latente, e se disseminar na corrente sanguínea até infectar o sistema nervoso central (SNC). A infecção do SNC é a forma mais severa de criptococose humana.



Fonte: Adaptado de Lin & Heitman, 2006.

Reconhecer os sinais externos e responder adequadamente aos mesmos é essencial para que *C. neoformans* sobreviva tanto no ambiente quanto no hospedeiro. Para que a resposta seja desencadeada de forma adequada, vias de transdução de sinal são ativadas em resposta as condições adversas em que o fungo pode se encontrar (Kozubowski *et al.*, 2009). Tais respostas contribuem para a patogenicidade do fungo e conferem a ele os atributos de virulência necessários para a sua sobrevivência. No caso do *C. neoformans*, são diversos os fatores de virulência necessários para causar a criptococose (Bahn *et al.*, 2007).

A capacidade de crescimento à temperatura corporal de hospedeiros mamíferos é um diferencial para que o patógeno tenha sucesso na infecção e desenvolvimento da doença nestes hospedeiros. Um dos genes envolvidos na tolerância a altas temperaturas é o gene que codifica a calcineurina (*CNA*). Estudos com este gene demonstram que mutantes de calcineurina são incapazes de crescer a 37 °C bem como apresentam virulência atenuada em modelo de infecção animal, porém crescem normalmente na temperatura ótima para *C. neoformans* (Odom *et al.*, 2007). Outros estudos também constataram que outros genes são essenciais

para a tolerância à temperatura corporal de hospedeiros mamíferos. A via que compreende *PKC1* está intimamente ligada à integridade de parede, tal via é ativada por meio de estresse oxidativo através de fosforilação de *Mpk1*. Mutantes de *PKC1* apresentam diversos fenótipos, dentre eles perturbação da parede celular, alteração na produção de cápsula e melanina além da inviabilidade das células a 37 °C (Gerik *et al.*, 2008; Djordjevic, 2010).

Um fator interessante e ímpar em *C. neoformans*, é a produção da cápsula polissacarídica (Steenbergen & Casadevall, 2003). A cápsula é composta de dois principais polissacarídeos, glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), e funciona como um verdadeiro escudo contra as diversas condições em que o *C. neoformans* pode ser submetido servindo como proteção contra dissecação no ambiente e à fagocitose por predadores ambientais como amebas (Steenbergen *et al.*, 2003). Dentre as funções desta cápsula no hospedeiro, esta inibe a resposta imunitária, causa depleção do sistema complemento e diminui a capacidade de apresentação de antígenos pelos monócitos (Vecchiarelli, 2003; Voelz & May, 2010). Além dos efeitos supracitados, a cápsula também protege o fungo da ação oxidativa no ambiente intracelular hostil dos macrófagos (Zaragoza *et al.*, 2008). Mutantes cuja produção da cápsula está prejudicada tem sua virulência atenuada em modelos animais (O'Meara & Alspaugh, 2012).

A produção de melanina ocorre como resposta a estímulos ambientais tal como privação de glicose no meio extracelular, ativando assim a via do AMP cíclico (AMPC) e culminando na produção de melanina pelo fungo quando este encontra-se na presença de substratos fenólicos tais como L-DOPA (Hu *et al.*, 2007; Kronstad *et al.*, 2011; Nurdeen *et al.*, 1979). Tal atributo confere vantagem ao fungo quando este é exposto a radiação UV, solar e gama, bem como confere proteção às drogas antifúngicas e radicais livres (Wang & Casadevall, 1994; Casadevall *et al.*, 2000), sendo a principal enzima envolvida na melanização a lacase ou fenoloxidase, codificada pelos genes *LAC1* e *LAC2* (Salas *et al.*, 1996; Pukkila-Worley *et al.*, 2004).

O *C. neoformans* possui outros atributos de virulência importantes para o estabelecimento da doença em pacientes imunocomprometidos. Após a inalação as leveduras ou esporos atingem o epitélio pulmonar e em seguida, as vias aéreas inferiores permanecendo nos alvéolos. Neste ambiente, o fungo entra em contato com os macrófagos, e observa-se a produção de fosfolipases favorecendo o início

da infecção pulmonar, por permitirem a adesão do fungo no epitélio pulmonar (Ganendren, 2006; Djordjevick, 2010). A deleção de *PLB1*, gene que codifica a fosfolipase B, tem como principal efeito a atenuação da virulência em modelos animais e redução do crescimento quando submetido ao teste de macrófagos, indicando assim, que a secreção de fosfolipase é um fator determinante para a virulência (Cox *et al.*, 2001).

Um fator importante para o desenvolvimento e estabelecimento da criptococose em sua forma mais grave, a meningoencefalite criptocócica, é a urease. O agravamento da doença ocorre quando as leveduras se disseminam pela corrente sanguínea até alcançar à barreira hematoencefálica (BHE), lá o *Cryptococcus* atravessa esta barreira tendo acesso ao sistema nervoso central (Idnurm *et al.*, 2005). A produção de urease tem sido reportada como responsável por essa travessia. Estudos têm demonstrado que mutantes do gene *URE1* possuem dificuldade de causar a forma mais severa da doença em modelos animais (Cox, 2000). O correto funcionamento das proteínas acessórias de *Ure1* também parece ser o fator determinante para a virulência do fungo, logo a ativação de *URE1* é necessária para que ocorra a invasão no SNC, bem como a aquisição de níquel, haja vista que a urease é uma apoenzima (Singh *et al.*, 2013; Morrow & Fraser, 2013).

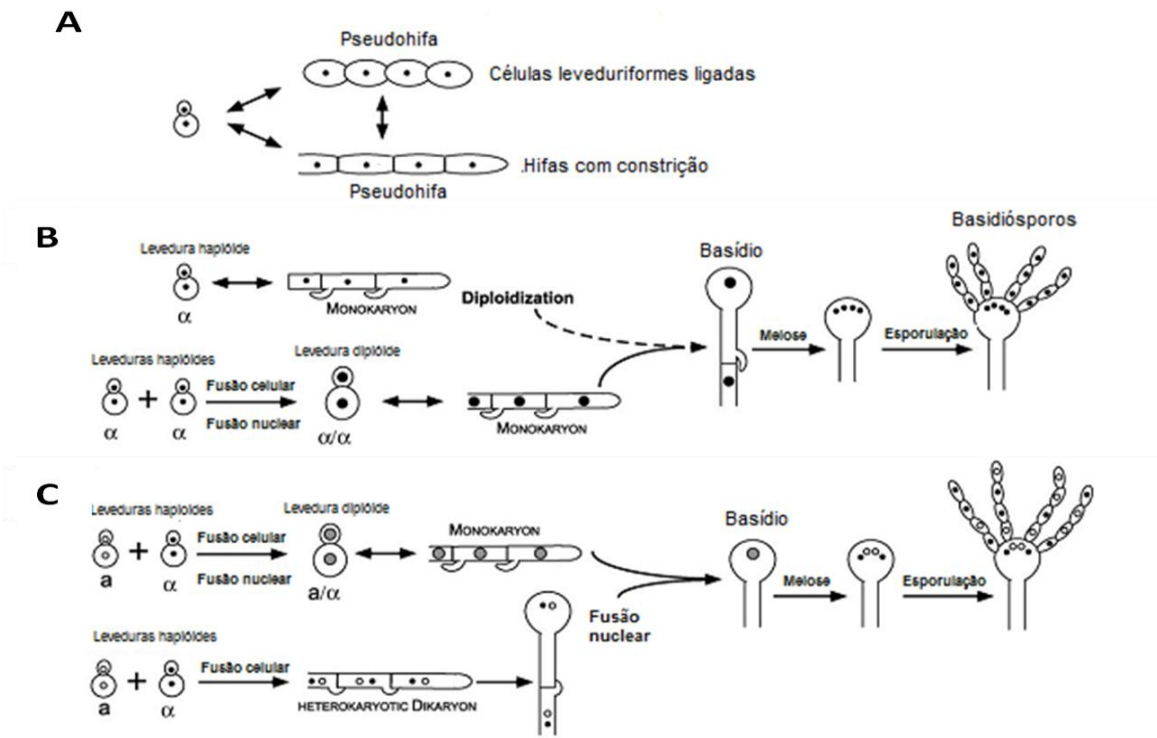
### 1.2 Fases morfológicas de *C. neoformans*

*C. neoformans*, tradicionalmente, não é considerado um fungo dimórfico. Este fungo é comumente isolado como levedura haploide, que pode vir a se diferenciar em hifas em condições específicas tais como presença de um parceiro sexual oposto e privação de fontes de nitrogênio (Xue *et al.*, 2007; Tscharke *et al.*, 2003).

Existem duas diferentes morfologias deste fungo durante o seu ciclo de vida. Em sua fase vegetativa, este fungo é encontrado na forma de levedura, se reproduzindo por brotamento, ainda sim, podem-se encontrar estruturas que remetem à morfologia de hifas (pseudohifas) ou também este fungo pode sofrer frutificação haploide, quando se encontra em condições ambientais e nutricionais severas. Na fase sexuada, as leveduras produzem feromônios quando em contato com seu tipo sexual oposto, onde ocorre a fusão celular e conseqüentemente a produção de hifas dicarióticas de basídios, onde ocorre a fusão celular dos núcleos,

seguida de meiose, resultando na produção de quatro núcleos que sofrem mitose, produzindo quatro cadeias de basidiósporos (Lin, 2009) (**Figura 3**).

**Figura 3** - Fases do ciclo de vida de *C. neoformans*. Fase vegetativa ou assexuada: (A) diferenciação em pseudohifas e (B) futificação haploide. Fase sexuada: (C) acasalamento.



Fonte: Adaptado de Lin, 2009.

A forma de pseudohifa (**Figura 3a**) é tida como uma forma intermediária geralmente encontrada quando o fungo está em associação com amebas. Tal forma pode ser capaz de resistir à fagocitose por amebas de vida livre presentes no solo, servindo como um mecanismo de escape de *C. neoformans* contra seus predadores (Lin, 2009).

O *C. neoformans* utiliza um sistema de acasalamento bipolar, nos quais existem dois tipos sexuais **a** e  $\alpha$  que quando se encontram (**Figura 3c**), secretam feromônios em privação de fontes de nitrogênio dando início à fusão celular destas células (Hull & Heitman, 2002) A célula dicariótica alonga-se, iniciando o crescimento filamentoso e os núcleos são transferidos hifa por hifa por meio das conexões em forma de grampo que se fundem à hifa seguinte. No final da cadeia, é formado o basídeo, onde ocorre a fusão nuclear seguida de meiose dando origem a quatro cadeias de basidiósporos que sofreram mitoses (Wickes, 2002; Lin, 2009).



A reprodução sexuada em fungos é regulada pelo *locus* de tipo sexual, *mating type locus (MAT)* que define a identidade do fungo. Em *C. neoformans*, o *locus MAT* compreende mais de 20 genes, alguns podendo afetar a virulência do fungo (Metin *et al.*, 2010).

Os estímulos conhecidos que influenciam positivamente a reprodução de *C. neoformans* são: extrato de vegetais (suco V8), presença íons de cobre, limitação de nitrogênio, presença de ácido indolacético (IAA), presença de mio-inositol. Entre os estímulos que reprimem a reprodução sexuada em *C. neoformans* se podem listar a presença de luz, altos níveis de CO<sub>2</sub>, alta umidade e altas temperaturas (Kent *et al.*, 2008; Lin, 2009; Wang & Lin, 2011).

A associação de *C. neoformans* com plantas é conhecida e aceita, porém não se sabe se na natureza o fungo realiza o acasalamento sobre a superfície das plantas em que ele comumente está em associação. Em 2007, Xue e colaboradores realizaram experimentos de acasalamento na superfície de plantas e também em meio MS (Murashige and Skoog), que comumente é utilizado para crescimento de plantas, acrescido de mio-inositol e ácido indolacético, neste experimento, concluiu-se que *C. neoformans* em condições controladas (laboratório) foi capaz de acasalar na superfície de plantas.

Além do meio V8 e MS, o meio SLAD (*synthetic low ammonium dextrose*) e Filament Agar, mimetizam situações de privação de nitrogênio e permitem que ocorra a frutificação haploide em *C. neoformans*. A detecção de nitrogênio no ambiente em *C. neoformans* é mediada por um transportador de amônio *Amt2*. Quando este gene é mutado, as cepas não conseguem desenvolver sua fase sexuada devido à baixa oferta de nitrogênio (Rutheford *et al.*, 2008).

Apesar dos sinais nutricionais serem de grande importância para o desenvolvimento sexual do fungo, outros fatores também são essenciais para que seja possível que o fungo inicie seu ciclo sexuado, dentre eles, a temperatura. Altas temperaturas inibem a formação de hifas, não sendo possível a reprodução do fungo a 37 °C, bem como a alta concentração de gás carbônico que inibe a fusão celular (Lin, 2009).

A presença de luz também regula negativamente o ciclo sexuado. Em outros fungos, tais como *N. crassa*, a luz regula o ciclo circadiano (Schafmeier & Diernfellner, 2011). Em *C. neoformans*, a luz inibe o acasalamento, porém mutantes dos genes que codificam as *White collar proteins*, *BWC1* e *BWC2*, se tornam

insensíveis à luz e conseguindo realizar fusão celular e acasalamento na presença de luz além de serem hipersensíveis à luz UV (Idnurm & Heitman, 2005).

O acasalamento em *C. neoformans* ainda não foi observado em meio líquido, indicando assim, que o fungo tem preferência por realizar esse processo em superfície sólida e com baixa umidade, onde o fungo pode adentrar no meio de cultura (Xue *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2009).

Algumas vias de transdução de sinal envolvidas na coordenação do desenvolvimento sexual de *C. neoformans* são conservadas no reino fúngico. Duas vias, a via da MAP cinase (MAPK) ativada por feromônio, e a via do AMP cíclico (AMPc), necessária para o sensoriamento de nutrientes, estão intimamente relacionadas ao processo de acasalamento.

A via de sinalização mediada por feromônios é conservada em basidiomicetos e ascomicetos. Vários estudos foram conduzidos e homólogos desta via de *S. cerevisiae* foram encontrados em *C. neoformans* e caracterizados. *STE12* se demonstra importante no acasalamento, principalmente em células  $\alpha$  (Chang *et al.*, 2001).

Os genes que codificam os receptores de feromônio (*STE3a/ $\alpha$* ) são essenciais para o sensoriamento dos feromônios de acasalamento nos estágios iniciais (Chang *et al.*, 2003). Os receptores de feromônios são proteínas G heterotrimétricas responsáveis pela transdução de sinal no interior da célula para que ocorra a ativação da cascata das MAPK (Kozubowski *et al.*, 2009). Em *C. neoformans*, as MAP cinases envolvidas em acasalamento e filamentação haploide são controladas por *STE20*, *STE11*, *STE7* e *STE12* e estão a montante (*downstream*) das proteínas G (Davidson *et al.*, 2003).

A via do AMP cíclico e *PKA* além de estar envolvida com os fatores de virulência de *C. neoformans*, também está relacionada ao acasalamento (Kronstad *et al.*, 2011). *GPA1* codifica a subunidade  $\alpha$  da proteína G, a deleção deste gene prejudica o acasalamento em resposta a privação de nitrogênio, bem como prejudica outros fatores de virulência como cápsula e melanina, porém a adição de AMP cíclico ao meio de cultura restaura o fenótipo dos mutantes (Alspaugh *et al.*, 1997).

Em estudo realizado com o gene *CAC1*, que codifica a adenilato ciclase, foi demonstrado que a sinalização por AMP cíclico é crucial para o acasalamento e virulência em modelos animais (Alspaugh *et al.*, 2002), sendo que os mutantes não

conseguem acasalar, porém o fenótipo é restaurado por meio da adição de AMP cíclico ao meio, assim como observado com *GPA1*.

A via de sinalização da calcineurina, necessária para a tolerância térmica, também possui papel no desenvolvimento sexual deste patógeno. A deleção da subunidade catalítica (*CNA1*) ou regulatória (*CNB1*) torna os mutantes incapazes de produzirem hifas quando submetidas a cruzamento bilateral, porém conseguem acasalar tendo apenas uma cópia do gene selvagem, tal estudo também revelou que os mutantes destes genes conseguem sofrer fusão celular (Cruz *et al.*, 2001).

Inicialmente, acreditava-se que a filamentação haploide ocorria somente em tipos sexuais  $\alpha$ , devido à alta capacidade deste tipo sexual sofrer filamentação haploide em condições de privação de nitrogênio e à alta predominância deste tipo sexual no ambiente (Wickes *et al.*, 1996), porém foi demonstrado que o tipo sexual *a* também pode realizar frutificação haploide (Tscharke *et al.*, 2003).

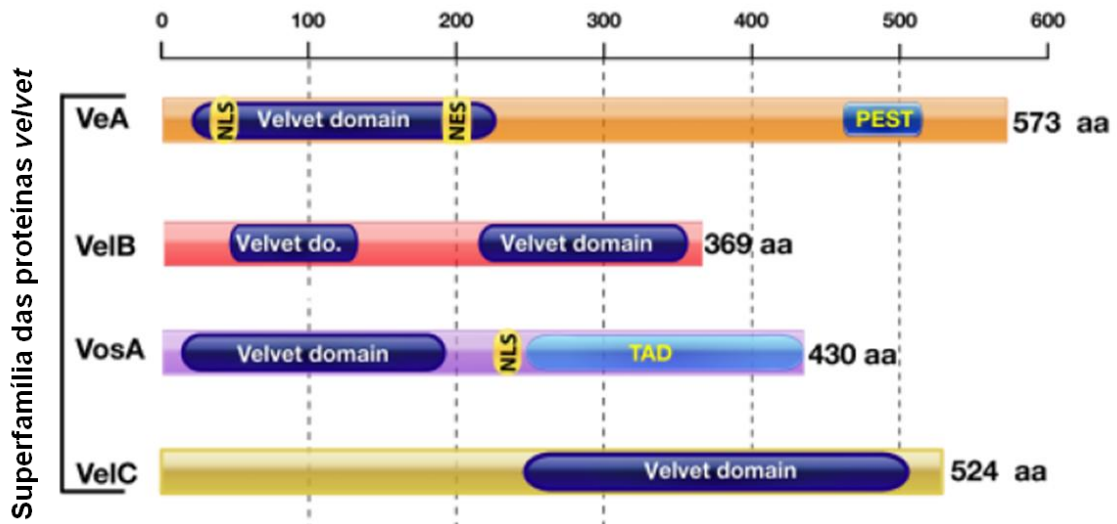
O mecanismo de frutificação haploide (**Figura 3b**) assemelha-se muito com a reprodução sexuada entre tipos sexuais opostos, principalmente por necessitar das mesmas condições ambientais. O processo ocorre da mesma forma, porém não há parceiro sexual oposto, as células se tornam diploides por meio de fusão celular entre as células de mesmo tipo sexual. A hifa forma conexões em forma de grampo que não se fundem à próxima hifa, no basídeo o núcleo sofre meiose formando quatro cadeias de basidiósporos (Lin & Heitman, 2005; Lin & Heitman, 2006). Tal mecanismo também parece ter a função de facilitar o acesso aos nutrientes (Phadke *et al.*, 2013)

### 1.3 As proteínas *velvet* em outros fungos

As proteínas *velvet* (*VeA*, *VeB*, *VosA* e *Ve/C*) foram inicialmente descobertas por Käfer em 1965 em um trabalho sobre a origem das translocações em *Aspergillus nidulans*, na qual foram gerados mutantes por meio de raio X. Neste experimento, Käfer observou que um mutante em especial, apresentava padrões anormais de conidiação (aumento) e desenvolvimento sexual (redução de corpos de frutificação), resultando numa colônia com aspecto aveludado, e, a partir deste momento, tal mutante fora denominado *VEA1* (Calvo, 2008).

Os membros da família *velvet* possuem um domínio comum, *velvet domain*, que está conservado em basidiomicetos e ascomicetos (**Figura 4**) (Bayram & Braus, 2012).

**Figura 4** - Arquitetura das proteínas *velvet*, *VeA*, *VelB*, *VosA* e *VelC*, em *Aspergillus nidulans*. TAD, domínio de ativação de transcrição; PEST, sequência rica em (P) prolina, (E) ácido glutâmico, (S) serina e (T) treonina; NLS, sinal de localização nuclear bipartite; NES, sinal de exportação nuclear; *Velvet domain*, domínio *velvet*.



Fonte: Adaptado de Bayram & Braus, 2012.

Os *velvets* têm como principal função o controle do desenvolvimento sexual e assexual em *A. nidulans* (Kim *et al.*, 2002) agindo como fatores transcricionais conservados em ascomicetos que podem controlar diferentes vias de sinalização frente aos diferentes estímulos ambientais (Calvo, 2008; Bayram & Braus, 2012).

Em revisão recente realizada por Bayram & Braus (2012), foi sugerido que os componentes da família *velvet* são fundamentais, também, no metabolismo secundário e em processos de diferenciação em ascomicetos.

Em *A. nidulans*, *VeA* possui 573 resíduos de aminoácidos com o domínio *velvet* acompanhado de um sinal de localização nuclear e sinal de exportação nuclear, todos localizados na região N-terminal da proteína. Na região C-terminal, a proteína apresenta uma região rica em Prolina, PEST, que é característica de proteínas instáveis (Bayram & Braus, 2012).

Estudos posteriores com o mutante *VEA1* de *A. nidulans* revelaram que o mesmo possuía uma mutação pontual no códon de iniciação, substituindo a Guanina por Timina, resultando numa proteína sem os primeiros 36 aminoácidos comparada à proteína produzida pelo selvagem (Kim *et al.*, 2002). Em seguida, foram construídas cepas mutantes de *VEA* ( $\Delta veA$ ) e cepas que super expressavam o

gene. Os resultados obtidos sugerem que *VEA1* ainda é funcional como regulador positivo do desenvolvimento sexual, porém a cepa mutante forma menos estruturas sexuais quando comparada à cepa selvagem. Também se concluiu que *VEA* está presente no desenvolvimento assexuado e sexuado, podendo ser crucial para o destino do desenvolvimento do fungo, já que os  $\Delta veA$  não produzem estruturas sexuais, mesmo em condições favoráveis e as cepas que super expressam o gene produzem mais estruturas sexuais que o selvagem (Kim *et al.*, 2002). *VEA* atua no desenvolvimento assexual dependente de luz (Mooney & Yager, 1990) e sugere-se que *VeA* seja necessário para a sua própria regulação negativa em *A. nidulans* (Kim *et al.*, 2009b).

Por meio dos estudos com *VEA*, foi possível identificar a importância deste gene no desenvolvimento fúngico e produção de metabólitos secundários em *A. nidulans* (Kim *et al.*, 2002; Calvo *et al.*, 2002; Calvo, 2008), logo, foi identificada a importância de se estudar este gene em fungos fitopatógenos e produtores de metabólitos secundários os quais afetam a saúde humana e economia mundial (Amare & Keller, 2014).

A deleção de *VEA* em *Aspergillus flavus* está relacionada ao defeito na produção de aflatoxina (Amaiike & Keller, 2009). A deleção de *VeA* no patógeno humano oportunista *Aspergillus fumigatus* leva a uma alteração no metabolismo secundário e na formação de esporos assexuados, resultando em um processo de esporulação dependente da disponibilidade de nitrogênio (Krappmann *et al.*, 2005). Já em *Penicillium chrysogenum*, a deleção de ortólogos de *VeA* (*PcveIA*) prejudica a morfogênese e a biossíntese de penicilina (Hoff *et al.*, 2010).

No fungo *Neurospora crassa*, a deleção do homólogo *ve-1* aumenta da produção de conídios, reduz a formação de hifas aéreas e a biossíntese de carotenóides (Bayram *et al.*, 2008a). No selvagem de *N. crassa* observa-se que há um aumento da transcrição do *ve-1* quando o fungo é submetido à luz vermelha, indicando uma relação de *VEA* com o sensoriamento de luz (Bayram *et al.*, 2008a).

A deleção do ortólogo *FvVE1* no fungo *Fusarium verticillioides* afeta o desenvolvimento sexual, causa redução da hidrofobicidade da superfície da colônia, alteração nos padrões de esporulação, aumento da quantidade de microconídios, porém a suplementação com estabilizadores osmóticos restauram o fenótipo dos mutantes, sugerindo assim, que o *FvVE1* está relacionado com defeitos na parede celular (Li *et al.*, 2006). Esses mutantes também são incapazes de sintetizar as

micotoxinas fumonisina e fusarina (Myung *et al.*, 2009). Em *Fusarium oxysporum*, *VEA* está envolvido na morfologia dos conídios e virulência deste patógeno em plantas, logo que os mutantes apresentam microconídios anormais e tem sua virulência atenuada (López-Berges, 2013).

Em *Acremonium chrysogenum*, a deleção do homólogo de *VeA*, *AcveA*, reduz a produção de cefalosporina C. Também sugere-se que o *AcveA* participa na regulação da fragmentação das hifas e na biossíntese da parede celular (Dreyer *et al.*, 2007).

Em *Botrytis cinerea*, a deleção de *VEA* tem como consequência o aumento da pigmentação da colônia e da produção de conídeos e redução da virulência em epiderme de cebola, fenótipos estes que são resgatados após a reconstituição do gene em questão (Yang *et al.*, 2013).

Em *H. capsulatum*, através do silenciamento gênico, foi possível demonstrar o envolvimento de *VEA1* na transição dimórfica dependente de temperatura deste patógeno humano, bem como na sua virulência. Os mutantes silenciados falharam ao produzir cleistotécio, realizaram a transição de levedura para micélio mais rapidamente, não foram capazes de mudar da forma miceliana para leveduriforme e demonstraram atenuação de virulência em modelo animal (Laskowski-Peak, *et al.*, 2012).

Em *A. nidulans*, *VeA*, forma complexo com *VelB* na ausência de luz através da porção N-terminal, e interage com *LaeA*, uma proteína envolvida no metabolismo secundário, na porção C-terminal (Bayram *et al.*, 2008b). Na família *velvet* a interação entre *VeA* e *VelB* tem o papel de conectar o *VelB* com o *LaeA* em espécies de fungos produtores de micotoxinas. Enquanto a interação entre *VeA* e *LaeA* ocorre no núcleo, a interação entre *VeA* e *VelB* ocorre tanto no núcleo quanto no citoplasma.

*VelB* se trata de uma proteína que possui 369 aminoácidos no modelo *A. nidulans*. Sua estrutura predita indica que a mesma não possui NES e NLS, por isso, necessita da interação com *VeA* para que seja levada ao núcleo. (Bayram & Braus, 2012). *VelB*, diferentemente dos outros *velvets*, possui dois domínios *velvet*, o primeiro na porção N-terminal e o segundo na porção C-terminal.

*VelB* em *A. nidulans* está envolvido na regulação de metabólitos secundários e desenvolvimento fúngico dependente de luz. Estudos conduzidos a fim de caracterizar este membro da família *velvet*, revela que em alguns organismos, tais

como *Fusarium fujikuroi* e *A. nidulans*, *VELB* possui um fenótipo semelhante ao encontrado em mutantes de *VEA*, caracterizado por diminuição do metabolismo secundário e virulência, principalmente quando os dois genes são deletados em *F. fujikuroi* (Wiemann *et al.*, 2010; Bayram & Braus, 2012). Sabe-se que *VelB* interage diretamente com *VeA* e *VosA* em resposta a estímulos ambientais (Bayram *et al.*, 2008b).

Em *C. neoformans*, a deleção de *VELB* tem como principal efeito a extinção da produção de hifas provenientes do processo de acasalamento no cruzamento bilateral entre os mutantes, bem como extingue os eventos de fusão, porém não foram observadas alterações na morfologia das hifas quando as cepas foram submetidas ao acasalamento unilateral e a ausência deste gene parece não afetar os principais fatores de virulência deste fungo (Barros, 2014).

*VelC* foi a última proteína *velvet* a ser descoberta, ela possui 524 resíduos de aminoácidos e um domínio *velvet* que se encontra na região C-terminal em *A. nidulans*. Ainda existem poucos estudos de caracterização funcional de *VELC* (Bayram & Braus, 2012).

Recente caracterização em *A. nidulans* indica que *VELC* tem a função de regulador positivo no desenvolvimento sexual, assemelhando-se com *VOSA*. No mesmo estudo, foi verificado que *VelC* e *VosA* interagem *in vivo* e *in vitro* (Park *et al.*, 2014). Em outros fungos, como *F. oxysporum* e *A. fumigatus*, os mutantes de *VELC* apresentam fenótipos sutis quando comparados aos outros mutantes dos *velvets* nestes organismos (Park *et al.*, 2013; López-Berges *et al.*, 2012), estes resultados indicam que *VELC* possua uma função acessória aos demais *velvets* (Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010).

*VosA*, o quarto membro desta família em *A. nidulans*, possui 430 aminoácidos e apresenta o domínio *velvet* na porção N-terminal e um domínio NLS (Bayram & Braus, 2012). *VosA* está envolvido na biossíntese de trealose e na maturação de conídios conferindo resistência aos conídios (Yu, 2010). A deleção de *VOSA* tem como principal fenótipo a má formação do cleistotécio e inviabilidade dos esporos produzidos (Ni & Yu, 2007). Em outros ascomicetos, tais como *Aspergillus fumigatus*, a deleção de *VosA* provoca sensibilidade à estresse osmótico e a luz UV (Park *et al.*, 2012).

Em outros fungos, como *H. capsulatum*, *VOSA*, conhecido neste fungo como *RYP2*, está envolvido no dimorfismo, na resposta a altas temperaturas e viabilidade de esporos (Webster & Sil, 2008).

Também foi identificado o gene *VOSA* em *C. neoformans*. Sua deleção não altera os principais fatores de virulência neste fungo, porém extingue os eventos de fusão, bem como o acasalamento no cruzamento bilateral dos mutantes e altera a morfologia das hifas quando realizado o cruzamento unilateral dos selvagens com os mutantes deste gene (Peconick, 2013).

Em suma, os principais fenótipos encontrados nos mutantes de *VEA* e *VELC*, estão listados na **Tabela 1** deste trabalho.

**Tabela 1** - Lista dos fenótipos conhecidos de *VEA* e *VELC* em diversos fungos. ND: Não descrito. (Continua).

Organismo	$\Delta veA$	$\Delta veC$	Referências
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Produção precoce dos conidióforos, capacidade reduzida de germinação dos conídios; redução da atividade de proteases.	Semelhante ao <i>wild-type</i> .	Krappmann <i>et al.</i> , 2005; Park <i>et al.</i> , 2012 ; Dhingra <i>et al.</i> , 2012
<i>A. nidulans</i>	Defeitos na produção de estruturas sexuais; aumento da produção de conídios.	Redução da produção de estruturas sexuais; aumento da produção de conídios.	Kim <i>et al.</i> , 2002 ; Park <i>et al.</i> , 2014
<i>A. parasiticus</i>	Redução do diâmetro da colônia; bloqueio da produção de intermediários da aflatoxina; ausência da produção de estruturas de resistência.	ND	Calvo <i>et al.</i> , 2004
<i>A. flavus</i>	Redução da produção de micotoxinas e escleródio.	ND	Duran <i>et al.</i> , 2007; Amaike & Keller, 2009
<i>Acremonium chrysogenum</i>	Fragmentação precoce das hifas; alteração na parede celular; redução da produção de cefalosporina C.	ND	Dreyer <i>et al.</i> , 2007
<i>Botrytis cinerea</i>	Aumento da conidiação e produção de melanina; sensibilidade ao estresse oxidativo; redução da produção de estruturas sexuais e virulência.	ND	Yang <i>et al.</i> , 2013



**Tabela 1** - Lista dos fenótipos conhecidos de *VEA* e *VELC* em diversos fungos. ND: Não descrito. (Conclusão).

Organismo	$\Delta veA$	$\Delta veIC$	Referências
<i>Fusarium fujikuroi</i>	Redução do micélio aéreo e aumento da pigmentação; redução da produção de microconídios; aumento da produção de estruturas sexuais.	ND	Weimann <i>et al.</i> , 2010
<i>F. graminearum</i>	Redução da hidrofobicidade do micélio, do desenvolvimento e pigmentação do micélio, resistência ao estresse osmótico e de parede; aumento da produção de conídios; redução da produção de metabólitos secundários e redução da virulência em plantas.	ND	Jiang <i>et al.</i> , 2011; Merhej <i>et al.</i> , 2012
<i>F. oxysporum</i>	Alteração na morfologia dos conídios; virulência atenuada em plantas.	Redução do tamanho dos conídios; semelhante ao <i>wild-type</i>	Lopez-Berges <i>et al.</i> , 2013
<i>F. verticillioides</i>	Defeitos na parede celular; redução da hidrofobicidade do micélio.	ND	Li <i>et al.</i> , 2006; Myung <i>et al.</i> , 2009
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Redução da produção de estruturas sexuais e micotoxinas; atenuação da virulência.	ND	Laskowski-Peak, <i>et al.</i> , 2012
<i>Magnaporthe oryzae</i>	Retardo no crescimento da colônia; redução da produção de conídios.	Redução da conidiação, integridade da parede celular apressoria dos conídios.	Kim <i>et al.</i> , 2014
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Redução da produção de melanina; redução do micélio aéreo; redução da hidrofobicidade e defeitos no sensoriamento de luz.	ND	Choi & Goodwin, 2011
<i>Neurospora crassa</i>	Aumento da produção de conídios; redução do tamanho das hifas.	ND	Bayram <i>et al.</i> , 2008a
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Redução da produção de penicilina, alteração na morfologia das hifas e insensibilidade à luz.	Redução na síntese de penicilina.	Hoff <i>et al.</i> , 2010; Kopke <i>et al.</i> , 2013
<i>Ustilago maydis</i>	Semelhante ao <i>wild-type</i>	Gene ausente	Karakkrat <i>et al.</i> , 2013

Fonte: Produzido pelo próprio autor.

#### 1.4 Interações entre os *velvets*

As interações entre os *velvets* foram descobertas inicialmente no modelo *A. nidulans*. Por meio de purificação por afinidade em tandem, do inglês *Tandem Affinity Purification (TAP)*, foi possível observar que *VeA* e *VelB* interagem, bem como *VeA* também conseguia interagir com *LaeA*, uma proteína necessária na produção de metabólitos secundários (Bayram *et al.*, 2008b). Tais interações ocorrem em condições específicas. A interação entre *VeA* e *VelB* ocorre somente na ausência de luz, sendo este estímulo ambiental um repressor na formação deste heterodímero (Bayram & Braus, 2012). Para que o heterodímero *VeA-VelB* vá para o núcleo, a importina  $\alpha$  *KapA*, se liga a *VeA*, auxiliando a passagem do heterodímero do citoplasma para o núcleo (Stinnett *et al.*, 2007; Araújo-Bazán *et al.*, 2009).

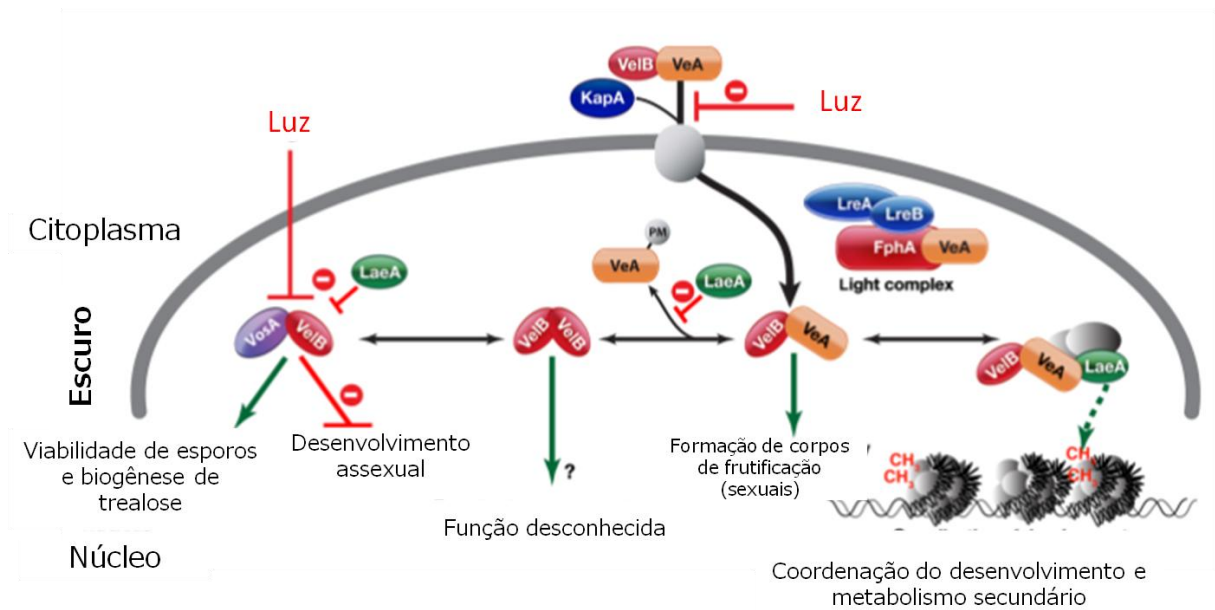
No núcleo, o heterodímero *VeA-VelB* pode continuar como heterodímero e culminar na formação de corpos de frutificação ou também pode ser formado o complexo heterotrimérico *VelB-VeA-LaeA*, induzindo o desenvolvimento sexual e metabolismo secundário (Bayram & Braus, 2008b; Calvo *et al.*, 2002). Outra interação que pode ocorrer com *VeA* é a interação com o complexo fotorreceptor *LreA-LreB-FphA* de *A. nidulans* (Purschwitz *et al.*, 2008; Purschwitz *et al.*, 2009; Bayram *et al.*, 2010; Etxebeste *et al.*, 2010).

Também se sabe que *VelB* pode formar um homodímero (*VelB-VelB*), cuja função ainda é desconhecida (Park *et al.*, 2012). Outra interação que envolve *VelB* é a interação desta proteína com *VosA*. Tal interação também é formada em resposta a ausência de luz e está envolvida com a biogênese do dissacarídeo trealose e consequentemente viabilidade de esporos, haja vista que este dissacarídeo protege os esporos das intempéries do ambiente (Park *et al.*, 2012).

Mais recentemente foi observado que o último *velvet* descoberto, *VelC*, interage *in vivo* (duplo-híbrido) e *in vitro* (GST pull-down) com *VosA*, porém ainda não se sabe em quais condições esta interação ocorre e qual o principal resultado desta interação (Park *et al.* 2014).

As principais interações entre os *velvets* em *A. nidulans* estão esquematizadas na **Figura 5**.

**Figura 5** - Interações das proteínas velvet *VeA*, *VelB* e *VosA* em *A. nidulans*.



Fonte: Adaptado de Bayram & Braus, 2012.

Também foram identificadas as interações entre os *velvets* em outros fungos filamentosos onde os genes *velvets* foram estudados. Em *A. fumigatus*, por meio de purificação por afinidade em tandem (*TAP*) proveniente de células vegetativas, foi verificado que *VeA* de *A. nidulans* consegue interagir com *VelB* e *LaeA*, de *A. fumigatus* demonstrando assim, a conservação da interação entre as duas espécies de *Aspergillus* (Park *et al.*, 2012). Em *P. chrysogenum*, a interação entre os *velvets* neste modelo foi realizada primeiramente por meio de ensaio de duplo-híbrido no qual foi observado que *VeA*, *VelB* e *VosA* interagem diretamente entre si. Entretanto, *VelC* parece estar associado ao complexo por meio de interação com *VosA* e possivelmente com *VeA*. Afim de verificar esta interação *in vivo*, foram realizados ensaios de Complementação da fluorescência bimolecular (*BiFC*) onde *VeA* interage com *LaeA* e *VelB* no núcleo bem como ocorre a interação de *VosA-VeA*, *VelB-VelC*, *VeA-VelC* no núcleo (Kopke *et al.*, 2013).

Em *Botrytis cinerea*, foi verificada que há a interação entre *VeA* e *VelB* deste fungo quando realizado o ensaio de duplo-híbrido, porém os autores só realizaram o teste com *VeA* na isca e *VelB* na presa, sendo que a confirmação se dá também pela troca dos transcritos-alvo da isca para presa. Também não se sabem em quais condições esta interação ocorre (Yang *et al.*, 2013).

Estudo mais detalhado sobre a interação *VelB-VosA* de *A. nidulans* realizada por Ahmed e colaboradores (2013), revelou que o domínio *velvet* de *VosA* se trata de um domínio de ligação ao DNA e que a estrutura deste domínio é similar ao *NF- $\kappa$ B* presente em mamíferos e neste mesmo estudo os autores especulam que o domínio *velvet* é um domínio de ligação ao DNA, podendo inferir que as proteínas *velvets* agem como fatores transcricionais que respondem a diversos estímulos formando complexos entre si e interagem também com outras proteínas.

A família *velvet* de proteínas são fatores conservados que possuem um papel crucial no desenvolvimento sexual e assexuado, morfologia e produção de metabólitos secundários. Em suma, os membros desta família agem de forma coordenada em resposta a estímulos ambientais e a sua deleção pode desregular o desenvolvimento assexuado e sexual dependente de luz (*VeA*), prejudicar a produção e a viabilidade de conídios (*VosA* e *VelB*), prejudicar a biossíntese de metabólitos secundários (*VeA* e *VelB*) e alterar a morfologia das hifas (*VelC*).

Em 2012, Bayram e Braus identificaram as proteínas *velvet* em basidiomicetos, inclusive em *C. neoformans*. Devido ao papel das proteínas *velvet* na biologia, morfogênese, desenvolvimento sexual e produção de metabólitos secundários, nosso grupo se questionou qual seria o principal papel destes genes no modelo *C. neoformans*, principalmente sobre os fatores de virulência, parede celular, membrana celular e reprodução sexuada deste fungo, haja vista que o processo de acasalamento é um processo que também confere variabilidade genética e consequentemente adaptabilidade do fungo (Hull & Heitman, 2002; Lin & Heitman, 2006; Lin, 2009; Phadke *et al.*, 2013).

A fim de compreender o papel de *VEA* e *VELC* no patógeno humano *C. neoformans*, que se trata de um basidiomiceto, o presente estudo foi conduzido, haja vista que até o momento somente os *velvets* de *Ustilago maydis* (*VelB* e *VosA*) foram caracterizados, nos quais  $\Delta umv1$  (identificado pelos autores como *VosA*) possui virulência atenuada associada a defeito de desenvolvimento sexual, e  $\Delta umv2$  (identificado pelos autores como *VelB*) que possui virulência reduzida e retardo na produção de teliósporos, porém  $\Delta umv3$  (identificado pelos autores como *VelB*) não apresenta alterações de fenótipo em relação ao selvagem (Karakkat *et al.*, 2013).

Utilizando-se de ferramentas de bioinformática, foi realizada uma comparação (*Blastp*) das sequências preditas das proteínas *velvet*, dentre elas *VeA* e *VelC*, utilizando o banco de dados de humanos (*Homo sapiens*) no NCBI:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Essas proteínas muito conservadas e específicas de fungos não foram identificadas em humanos. Os dados moleculares experimentais gerados nesse trabalho visam entender o papel de *VEA* e *VELC* na morfogênese, viabilidade e patogenicidade de *C. neoformans*, e são um ponto de partida para o estudo desta família para uma melhor caracterização da biologia deste micro-organismo.

## 2 OBJETIVOS

- Elucidar os papéis de *VEA* e *VELC* sobre os principais fatores de virulência de *C. neoformans* por meio de deleção gênica;
- Avaliar a virulência dos mutantes de *VEA* e *VELC* em modelo de infecção fúngica *in vitro*;
- Obter cepas para posterior teste de interação entre as proteínas *velvet* de *C. neoformans* por meio de duplo-híbrido.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Linhagens e meios de cultura utilizados

##### 3.1.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas linhagens de *C. neoformans* variedade *grubii* KN99 $\alpha$  e KN99 $\alpha$  sorotipo A. Experimentos de virulência em macrófagos utilizaram a linhagem de macrófagos peritoniais J774.A1 (ATCC TIB-67). Foram utilizadas as bactérias *Escherichia coli* competentes *Stellar*<sup>TM</sup> - HST08 (Clontech) para a replicação dos plasmídeos com os insertos. Para os testes de interação proteína-proteína (duplo-híbrido) foram utilizadas as linhagens Y2HGold (*MATa*) Y187 (*MAT $\alpha$* ) de *Saccharomyces cerevisiae* (Clontech).

##### 3.1.2 Meios de cultura

##### 3.1.2.1 Meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*): para manutenção de *C. neoformans*

Extrato de levedura	1 %
D-Glicose	2 %
Peptona	2%
Ágar	2%

O potencial hidrogeniônico (pH) utilizado foi 5,6 – Autoclavagem a 120 °C por 15 minutos.

##### 3.1.2.2 Meios de cultura para testes fenotípicos

a) Meios contendo *Congo Red*, Cloreto de sódio (NaCl), Cloreto de potássio (KCl), Sorbitol, Cafeína, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Tais reagentes foram acrescentados ao meio sólido YPD para a realização dos testes fenotípicos nas seguintes concentrações 1% e 0,5% de Congo Red, 1,5 M de NaCl, 2 M de Sorbitol, 1mg/mL de Cafeína, 0,05% de SDS, 1mM e 5mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A cafeína e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram adicionados após autoclavagem do meio

O pH utilizado foi 5,6 – Autoclavagem a 120 °C por 15 minutos.

##### b) Meio L-DOPA Ágar

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	29,4 mM
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10 mM

Glicina	13 mM
D-Glicose	15 mM
Tiamina	3 $\mu$ M
L-Dopa	2 mM
Ágar	1,5 %

O pH utilizado foi 5,5 (Ajustado com KOH e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) – Esterelização da solução de sais por filtração em filtro 0,22  $\mu$ m para posterior adição do ágar.

c) Meio DMEM + MOPS – Meio indutor de cápsula

DMEM	13,4 g/L
MOPS	23 mM
NaHCO <sub>3</sub>	22 mM
Ágar	1,8%

O meio DMEM acrescido de MOPS foi esterelizado por filtração em filtro de 0,22  $\mu$ m e posterior adição do ágar. O pH utilizado foi 7,0.

d) Christensen's Urea Agar – Meio para teste de urease

Peptona	1 %
Cloreto de Sódio	5 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 %
<i>Phenol Red</i> 0,2%	8 mL
Uréia	20 %
Dextrose	1 %
Ágar	2%

O pH utilizado foi 6,9 – A base do meio de Christensen foi autoclavada a 120 °C por 15 minutos. A base foi resfriada a 55 °C para a adição da solução de uréia e dextrose previamente esterelizada em filtro de 0,22  $\mu$ m.

e) Meio emulsão gema de ovo – Meio para teste de fosfolipase

Peptona	1 %
Glicose	2 %
Cloreto de sódio	1 M
Cloreto de cálcio	0,005 M
Ágar bacteriológico	2%



Autoclavagem a 120 °C por 15 minutos. Em seguida, resfriado a 55 °C para adição da emulsão gema de ovo (50 % gema de ovo, 50 % salina).

### 3.1.2.3 Meios de cultura indutores de acasalamento em *C. neoformans*

#### a) Meio Agar Filament

YNB 0,67 %

Ágar bacteriológico 4 %

O pH utilizado foi 5 – Autoclavagem a 120 °C por 40 minutos.

Após autoclavagem adição 2,5 % de glicose 20 %.

#### b) Meio comercial Murashige and Skoog (MS)

Meio MS 0,44 %

Ágar bacteriológico 4 %

O pH utilizado foi 5 – Autoclavagem a 120 °C por 15 minutos.

### 3.1.2.4 Meios de cultura com diferentes concentrações de Nitrogênio

#### a) Meio SLAD (*Synthetic Low Ammonium Dextrose*)

YNB 0,17 %

Sulfato de amônio 5 µM

Ágar bacteriológico 2 %

O pH utilizado foi 5 – Autoclavagem a 120 °C por 40 minutos.

Após autoclavagem, adição de glicose na concentração final de 2 %.

#### b) Meio SMAD (*Synthetic Medium Ammonium Dextrose*)

YNB 0,17 %

Sulfato de amônio 500 µM

Ágar bacteriológico 2 %

O pH utilizado foi 5 – Autoclavagem a 120 °C por 40 minutos.

Após autoclavagem, adição de glicose na concentração final de 2 %.

#### c) Meio SHAD (*Synthetic High Ammonium Dextrose*)

YNB 0,17 %

Sulfato de amônio 5 mM

Ágar bacteriológico 2 %

O pH utilizado foi 5 – Autoclavagem a 120 °C por 40 minutos.

Após autoclavagem, adição de glicose na concentração final de 2 %.

### 3.1.2.5 Meio utilizado para crescimento de *E.coli*

#### a) Meio Luria-Bertani (LB)

Extrato de levedura	0,5%
Peptona	1%
NaCl	1%
Ágar	1,5%

O pH utilizado foi 7,0 – Autoclavagem a 120 °C por 20 minutos.

### 3.1.2.6 Meios utilizados para o Duplo-Híbrido (*Y2H*)

#### a) Meio YPDA

Extrato de Levedura	1%
D-Glicose	2 %
Peptona	2%
Ágar	2%
Hemisulfato de Adenina	20 mg/L

#### b) Meio SD

YNB	0,67%
Glicose	2%
Ágar	2%
Adenina	20 mg/L
Histidina	20 mg/L
Metionina	20 mg/L
Triptofano	20 mg/L
Leucina	50 mg/L

#### c) Meio SD/-Triptofano

YNB	0,67%
Glicose	2%
Ágar	2%
Adenina	20 mg/L

L-Histidina	20 mg/L
L-Metionina	20 mg/L
L-Leucina	50 mg/L

d) Meio SD/-Leucina

YNB	0,67%
Glicose	2%
Ágar	2%
Adenina	20 mg/L
L-Histidina	20 mg/L
L-Metionina	20 mg/L

e) Meio SD/ *Double Drop Out (DDO)*: Sem Triptofano e Leucina

YNB	0,67%
Glicose	2%
Ágar	2%
Adenina	20 mg/L
L-Histidina	20 mg/L
L-Metionina	20 mg/L

f) Meio SD/ *Quadruple Drop Out (QDO)*

YNB	0,67%
Glicose	2%
Ágar	2%
L-Metionina	20 mg/L

### 3.2 *Análise in silico do gene VEA e VELC de C. neoformans utilizando o banco genômico disponível*

As sequências genômica e proteica de *VEA* (CNAG\_02387.2) e de *VELC* (CNAG\_02697.2) de *C. neoformans*, disponíveis no banco de dados do *Broad Institute*

([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus\\_neoformans/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans/MultiHome.html)), foram identificadas tendo a sequência proteica de *VeA* de *A. nidulans* (Número de acesso: AAD42946.1) e de *VeIC* do mesmo organismo (Número de

acesso: XP\_659663.1) como referência e utilizando a ferramenta BLASTp (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comparação. Em seguida, as sequências proteicas foram confirmadas com a anotação do banco genômico.

Em adição, também foram encontrados homólogos de *VeA* em outros fungos (**Tabela 2**) e de *Ve/C* (**Tabela 3**), no qual foi realizado o alinhamento múltiplo das sequências através da ferramenta *CLUSTALW algorithm* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), cuja finalidade foi buscar regiões conservados entre as sequências proteicas dos fungos listados na **Tabela 2** e **Tabela 3**. Em seguida, foi feita a análise de identidade e similaridade por meio de alinhamento em pares ([https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)) entre a sequência de *C. neoformans* com as sequências dos demais fungos, no caso da sequência proteica de *VeA*, a análise foi feita com a sequência antiga (AFR95444.1). O alinhamento múltiplo também permitiu que fossem construídas árvores filogenéticas por meio do software *ClustalW Phylogeny* ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/clustalw2\\_phylogeny/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/clustalw2_phylogeny/)) para estabelecer a relação filogenética destes organismos.

**Tabela 2** - Lista de micro-organismos utilizados para comparação de sequências proteicas de *VeA*. (Continua).

Organismo	Número de Acesso no NCBI
<i>Acremonium chrysogenum</i>	CAL68582.1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CAE47975.1
<i>Aspergillus flavus</i>	ABC41069.1
<i>Aspergillus nidulans</i>	AAD42946.1
<i>Aspergillus parasiticus</i>	AAS07022.1
<i>Botrytis cinerea</i>	CCD47187.1
<i>Coprinopsis cinerea</i>	XP_001830267. 2
<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001242982. 1
<i>Cryptococcus gattii</i>	XP_003194190. 1
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> (H99)	AFR95444.1; AFR95444.2
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (JEC21)	XP_571129. 1
<i>Dothistroma septosporum</i>	EME47645.1
<i>Fusarium graminearum</i>	AEY76160.1
<i>Histoplasma capsulatum</i>	ACB59235.1
<i>Laccaria bicolor</i>	XP_001878780.1
<i>Magnaporthe oryzae</i>	XP_003716073
<i>Neurospora crassa</i>	XP_957154.1

**Tabela 2** – Lista de micro-organismos utilizados para comparação de sequências proteicas de *VeA*. (Conclusão).

Organismo	Número de Acesso no NCBI
<i>Paracoccidioides brasiliensis (Pb18)</i>	EEH46851.1
<i>Paracoccidioides lutzii (Pb01)</i>	XP_002794525.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	XP_002559734.1
<i>Verticillium dahlie</i>	EGY15599.1
<i>Ustilago maydis</i>	XP_790350.1

Fonte: Produzido pelo próprio autor.

**Tabela 3** - Lista de micro-organismos utilizados para comparação de sequências proteicas de *Ve/C*.

Organismo	Número de Acesso no NCBI
<i>Aspergillus flavus</i>	ADE45324.1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_751849.1
<i>Aspergillus nidulans</i>	ABQ17968.1
<i>Coprinopsis cinerea</i>	XP_001837756.2
<i>Coccidioides immitis</i>	EAS37273.2
<i>Cryptococcus gattii</i>	XP_003196731.1
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> (H99)	AFR93993.1
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (JEC21)	XP_567664.1
<i>Fusarium oxysporum</i>	EGU84152.1
<i>Magnaporthe oryzae</i>	XP_003719005.1
<i>Paracoccidioides brasiliensis (Pb18)</i>	EEH45903.1
<i>Paracoccidioides lutzii (Pb01)</i>	XP_002789846.1

Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Também foi realizada a identificação dos principais domínios presentes na estrutura e composição da proteína *VeA* e *Ve/C* de *C. neoformans*. Tais domínios foram identificados nas proteínas *VeA* e *Ve/C* de *C. neoformans* tendo como referência os domínios encontrados em estudos anteriores realizados em *A. nidulans* e *A. fumigatus* (Bayram e Braus, 2012; Park *et al.*, 2012).

A identificação dos domínios *velvet* em ambas proteínas de *C. neoformans* foi obtida por meio da ferramenta *online Pfam* (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). A busca pelo domínio NLS foi obtida pelo software *NLS Predictor* ([http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_form.cgi](http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)). A procura pelo domínio PEST foi feita com o auxílio do software *EPestfind* (

bin/emboss/epestfind) e a busca pelo sinal de exportação nuclear (NES) foi obtida pelo *software* NetNES (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>).

As sequências dos domínios *velvet* de todas as proteínas desta família de *C. neoformans* foram alinhadas com o auxílio do *software* *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), comparadas e checadas. Após, foi construído um cladograma comparativo entre essas proteínas por meio do *software* *ClustalW2 Phylogeny* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/>) cujo objetivo foi relacionar estas proteínas evolutivamente.

### 3.3 Avaliação da função gênica de VEA e VELC através de deleção gênica no modelo *C. neoformans*.

#### 3.3.1 Construção do cassete de deleção dos genes VEA e VELC de *C. neoformans*

Os cassetes de deleção gênica para a obtenção de mutantes *knock out* foi construído por meio da técnica de *PCR Double-Joint*, previamente descrita por Kim *et al.*, 2009.

Primeiramente, foi feita a seleção do gene *VEA* através do banco de dados disponível no *Broad Institute* (CNAG\_02387.2) para que fosse possível a construção do cassete de deleção. Os códon de iniciação e de terminação do gene foram definidos para que fosse delimitada a região a ser deletada e com isso foram selecionados 1Kb acima e abaixo da ORF para o desenho de oligonucleotídeos a serem usados na deleção. Tais procedimentos também foram utilizados para a construção do cassete de deleção de *VELC* (CNAG\_02697.2).

Foram utilizados oito oligonucleotídeos para cada um dos genes, a fim de isolar os fragmentos de interesse e construir o cassete por *PCR Double Joint* (**Tabela 4**). Em seguida, foi realizada a transformação dos fragmentos do cassete de deleção por biobalística em leveduras haploides KN99 $\alpha$  e KN99 $\alpha$ .

Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados no estudo de *VEA* e *VELC* em *C. neoformans* (Continua).

Primer	Descrição	Sequência	TM (°C)	Uso
LF201	VeA1	GGGTTGGGTTTGATCCTGTGTA	66	<i>Double-Joint PCR-VEA</i>
LF202	VeA2	ATCATGTCATAGCTGTTTCCTGT GGCTGGGAATGATAAGAGGTG	66	<i>Double-Joint PCR-VEA</i>

**Tabela 4** – Oligonucleotídeos utilizados no estudo de *VEA* e *VELC* em *C. neoformans* (Continuação).

Primer	Descrição	Sequência	TM (°C)	Uso
LF020	M13Re	CAGGAAACAGCTATGACATGAT	62	<i>Double-Joint PCR</i>
LF028	NSL_hph	GCGGGAGATGCAATAGGTCAG	66	<i>Double-Joint PCR</i>
LF029	NSR_hph	AGCTCTCGGAGGGCGAAGAAT	66	<i>Double-Joint PCR</i>
LF188	NSL_nat	CTCCAGAACATTCGTGCTTAC	64	<i>Double-Joint PCR</i>
LF187	NSR_nat	AGCAAGACCCATCAAAGCTCTA	66	<i>Double-Joint PCR</i>
LF021	M13Fen	GTAAAACGACGGCCAGTGC	60	<i>Double-Joint PCR</i>
LF219	VeA7	GCACTGGCCGTCGTTTTACTCCGTCG TCTGATCTCTCAGC	66	<i>Double-Joint PCR-VEA</i>
LF221	VeA8	GCTTTTAGAGCAAGCCCGTGT	64	<i>Double-Joint PCR-VEA</i>
LF231	VeA9	AAGAGGCAAGAGTGCGAATCC	64	Confirmação de Deleção/Reconstituição do <i>locus-VEA</i>
LF222	VeA10	CGGTGATCTTTCTTCCCCAGT	64	Confirmação de Deleção/Reconstituição do <i>locus-VEA</i>
LF185	VeA11	TCGAATTGGCGCAGACAGTA	58	Confirmação de Deleção/Reconstituição do <i>locus-VEA</i>
LF186	VeA12	TGCGGCCAGATGTCTTGTTA	60	Confirmação de Deleção/Reconstituição do <i>locus-VEA</i>
LF255	VeARECF	CTTGTGGCTTTGGGATGAGGT	64	Reconstituição do <i>locus-VEA</i>
LF256	VeARECR	TGCGGACAGATAACGATTCCCTC	66	Reconstituição do <i>locus-VEA</i>
LF220	VelC1	CGTGCGTTCGATGTACTCTCA	64	<i>Double-Joint PCR-VELC</i>

**Tabela 4** – Oligonucleotídeos utilizados no estudo de *VEA* e *VELC* em *C. neoformans* (Continuação).

Primer	Descrição	Sequência	TM (°C)	Uso
LF229	VelC2	ATCATGTCATAGCTGTTTCCTG AATATTGCGATGGTGGCCTTC	62	Double-Joint PCR- VELC
LF230	VelC7	GCACTGGCCGTCGTTTTAC CATCGCTTTGCACAACCTTGAC	62	Double-Joint PCR- VELC
LF228	VelC8	CTGCGTCAACGTTTGTCTCC	64	Double-Joint PCR- VELC
LF227	VelC9	CATGTTACGACGGACCTTTGC	64	Confirmação de Deleção/Reconstituição do locus-VELC
LF223	VelC10	ATGCGGCGTCAGTGACCTCGTC	72	Confirmação de Deleção/Reconstituição do locus-VELC
LF233	VelC11	TCTTTGCGGTTTCAGATGCTAC	62	Confirmação de Deleção/Reconstituição do locus-VELC
LF224	VelC12	GCGAGTAGATGCGGAATGGTTG	68	Confirmação de Deleção/Reconstituição do locus-VELC
LF289	VelCRECF	GGATTTGATCCCATCCAGGTC	64	Reconstituição do locus-VELC
LF290	VelCRECR	CCAACGAAACGAGAGGGTACA	64	Reconstituição do locus-VELC
LF298	VeATHF	CATGGAGGCCGAATTCATGAGCCC GGCCAACGGC	75,1	Duplo-Híbrido (isca- VEA
LF300	VeATHR	GCAGGTCGACGGATCCTTACCGTC TCTCGTAGCTTCTCTCTTCC	69,4	Duplo-Híbrido (isca- pGBKT7) VEA
LF328	VelBTHF	CATGGAGGCCGAATTCATGTTTCCC TCAACAGGCA	63,6	Duplo-Híbrido (isca- pGBKT7) VELB
LF329	VelBTHR	GCAGGTCGACGGATCCTCATTGAC CACCTTCATCTT	60,1	Duplo-Híbrido (isca- pGBKT7) VELB
LF301	VelCTHF	CATGGAGGCCGAATTCATGCCTGT TCCACAACCC	64	Duplo-Híbrido (isca- pGBKT7) VELC
LF303	VelCTHR	GCAGGTCGACGGATCCTCAATCTC CTGTCCCTGTT	60,2	Duplo-Híbrido (isca- pGBKT7) VELC
LF317	VosATHF	CATGGAGGCCGAATTCATGTCCGC CCGCGCCCAT	77,4	Duplo-Híbrido (isca- pGBKT7) VOSA
LF336	VosATHRLo ng	GCAGGTCGACGGATCCTCAACCCA GCAGGTTGCCCAATC	72,9	Duplo-Híbrido (isca- pGBKT7) VOSA
LF306	VeATHPF	CAGTGAATTCCACCCATGAGCCCG GCCAACGGC	75,1	Duplo-Híbrido (presa- pGADT7) VEA



**Tabela 4** – Oligonucleotídeos utilizados no estudo de *VEA* e *VELC* em *C. neoformans* (Conclusão).

Primer	Descrição	Sequência	TM (°C)	Uso
LF307	VeATHPR	TATCGATGCCCCACCCTTACCGTCT CTCGTAGCTTCTCTCTTCC	69,4	Duplo-Híbrido (presa-pGADT7) <i>VEA</i>
LF315	VelBTHPF	CAGTGAATTCCACCCATGTTTCCC TCAACAGGCA	63,6	Duplo-Híbrido (presa-pGADT7) <i>VELB</i>
LF316	VelBTHPR	TATCGATGCCCCACCCTCATTGACC ACCTTCATCTT	60,1	Duplo-Híbrido (presa-pGADT7) <i>VELB</i>
LF310	VelCTHPF	CAGTGAATTCCACCCATGCCTGTT CCACAACCC	64	Duplo-Híbrido (presa-pGADT7) <i>VELC</i>
LF311	VelCTHPR	TATCGATGCCCCACCCTCAATCTCC TGTCCTGTT	60,2	Duplo-Híbrido (presa-pGADT7) <i>VELC</i>
T7	T7 (Forward)	TAATACGACTCACTATAGGG		PCR dos plasmídeos de Duplo-Híbrido

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para que a construção do cassete de deleção fosse possível, a reação de amplificação foi realizada em duas etapas (**Figura 6**). Para a primeira etapa, foi utilizada a enzima *PyroStart*<sup>TM</sup> Fast PCR (Fermentas Life Science). A reação foi realizada a partir de um mix constituído de 0,5 µM de cada oligonucleotídeo; 10 ng de DNA molde (DNA genômico de *C. neoformans* KN99a) para a obtenção dos fragmentos 1 + 2, que corresponde à região flanqueadora 5' de *VEA*, e 7 + 8, que corresponde à região flanqueadora 3' de *VEA*. O plasmídeo pPZPHYG foi utilizado para a amplificação do fragmento 3 + 4 que corresponde à região 5' do marcador seletivo *HPH*, controlado por promotor de actina de *C. neoformans* e do fragmento 5 + 6 que corresponde à região 3' de *HPH* (gene de resistência a Hygromicina B), o qual possui terminador *TrpC* de *C. neoformans*. O plasmídeo pPZPNAT também foi utilizado como molde para a amplificação do fragmentos 3 + 4 que corresponde à região 5' do marcador seletivo *NAT* (gene de resistência a Nourseotricina), controlado por promotor de actina de *C. neoformans* e 5 + 6 cujo fragmento corresponde à região 3' de *NAT*, o qual possui terminador *TrpC* de *C. neoformans*. pPZPNAT para a amplificação dos fragmentos 3 + 4 os quais correspondem à região 5' do marcador seletivo *HPH*, controlado por promotor de actina de *C. neoformans* e 5 + 6 cujo fragmento corresponde à região 3' de *NAT*, o qual possui terminador *TrpC* de *C. neoformans*. O mix foi finalizado utilizando água ultrapura para completar o

volume da reação de 20  $\mu$ L. Em tal etapa, os oligonucleotídeos utilizados foram LF201 e LF202 para o fragmento 1+2, que corresponde à região flanqueadora 5' de *VEA*; LF020 e LF028 para o fragmento 5' de *HPH*; LF021 e LF029 para o fragmento 3' de *HPH*; LF020 e LF188 para o fragmento 5' de *NAT*; LF021 e LF187 para o fragmento 3' de *NAT*; LF219 e LF231 para o fragmento 7+8 que corresponde à região flanqueadora 3' de *VEA* (**Figura 6a**). Todos os oligonucleotídeos utilizados no presente estudo estão descritos na **Tabela 4**. O ciclo utilizado para as reações foi:

95 °C por 1 minuto	} 40 vezes
95 °C por 5 segundos	
57 °C por 5 segundos	
72 °C por 1 minuto	
72 °C por 1 minuto	
4°C até o término da reação.	

Após as reações, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% a fim de checar os tamanhos esperados. Em seguida, os fragmentos foram purificados com o kit *GFX PCR DNA and Gel band purification Kit* (GE Healthcare) e quantificados. Os tamanhos esperados foram: 1 + 2: 1051 pb; 7 + 8: 890 pb, 3 + 4 *hph*: 1235 pb; 5 + 6 *hph*: 1295 pb; 3 + 4 *nat*: 639 pb; 5 + 6 *nat*: 1176 pb

Para a construção do cassete de deleção de *VELC*, foram amplificados os fragmentos 1 + 2 e 7 + 8 de *VELC* utilizando a *PyroStart™ Fast PCR* (Fermentas Life Science) utilizando os oligonucleotídeos LF220 e LF229 para a região 5' de *VELC* e LF230 e LF228 para a região 3' de *VELC* (**Figura 6a**). A reação foi realizada a partir de um mix constituído de 0,5  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo; 10ng de DNA molde (DNA genômico de *C. neoformans* KN99a) para a obtenção dos fragmentos 1 + 2, que corresponde à região flanqueadora 5' de *VELC*, e 7 + 8, que corresponde à região flanqueadora 3' de *VELC*. Os fragmentos 3 + 4 e 5 + 6, de ambas as marcas de seleção, obtidos da reação de *VEA* – *HPH* e *NAT* foram utilizados também para a construção do cassete de *VELC*. Após as reações, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% a fim de checar os tamanhos esperados. Em seguida, os fragmentos foram purificados com o kit *GFX PCR DNA and Gel band purification Kit* (GE Healthcare) e quantificados. Os tamanhos esperados foram: 1 + 2: 873 pb; 7 + 8: 936 pb.

Para a segunda etapa, cujo objetivo foi fusionar os fragmentos 1 + 2 com 3 + 4 e 5 + 6 com 7 + 8 em duas reações de amplificação (**Figura 6b**) distintas, foi feita

uma PCR de sobreposição para obtenção dos fragmentos 1 + 4 (1 + 4 – equivalente a região flanqueadora 5' de *VEA* fusionada à região 5' do marcador seletivo) e 5 + 8 (5 + 8 – equivalente à região flanqueadora 3' de *VEA* fusionada à região 3' do marcador seletivo). Para o fragmento 1 + 4 fusionado com *HPH*, o tamanho esperado foi de 2,2 Kb. Para o fragmento 5 + 8 fusionado com *HPH*, o tamanho esperado foi de 2,1 Kb. Em contrapartida, para o fragmento 1 + 4 fusionado com *NAT*, o tamanho esperado foi de 1,6 Kb e para o fragmento 5 + 8 fusionado com *NAT*, o tamanho esperado foi de 2,2 Kb. Em seguida, os tamanhos dos amplicons foram confirmados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Para amplificação dos fragmentos citados foram utilizados os oligonucleotídeos LF201 e LF028 para amplificar o fragmento 1 + 4 cuja marca escolhida foi *HPH*; LF029 e LF221 para amplificar o fragmento 5 + 8 cuja marca escolhida foi *HPH*. Para a marca *NAT*, foram utilizados os oligonucleotídeos LF201 e LF188 para amplificar o fragmento 1 + 4. E para o fragmento 5 + 8, foram utilizados os oligonucleotídeos LF187 e LF221. Os tamanhos esperados na primeira etapa foram: 1 + 2: 1051 pb; 7 + 8: 890 pb, 3 + 4 *hph*: 1235 pb; 5 + 6 *hph*: 1295 pb; 3 + 4 *nat*: 639 pb; 5 + 6 *nat*: 1176 pb.

Para as quatro reações da segunda etapa, foi escolhida a enzima *OneTaq*® *DNA Polymerase* (New England Biolabs) e utilizados os seguintes componentes para cada reação: 1U *OneTaq*® *DNA Polymerase*, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de dNTP's, 15 ng de cada fragmento, 1X de tampão e H<sub>2</sub>O até o volume final de 50 µL. O ciclo utilizado para as quatro reações foi:

94 °C por 2 minutos	} 40 vezes
94 °C por 30 segundos	
56 °C por 30 segundos	
68 °C por 4 minutos	
68 °C por 5 minutos	
4°C até o término da reação.	

Em seguida, os fragmentos obtidos foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados com kit *GFX PCR DNA and Gel band purification Kit* (GE Healthcare) e quantificados para posterior transformação por biobalística.

Para a segunda etapa de construção do cassete de *VELC*, também foi feita uma PCR de sobreposição para obtenção dos fragmentos 1 + 4 (1 + 4 – equivalente a região flanqueadora 5' de *VELC* fusionada à região 5' do marcador

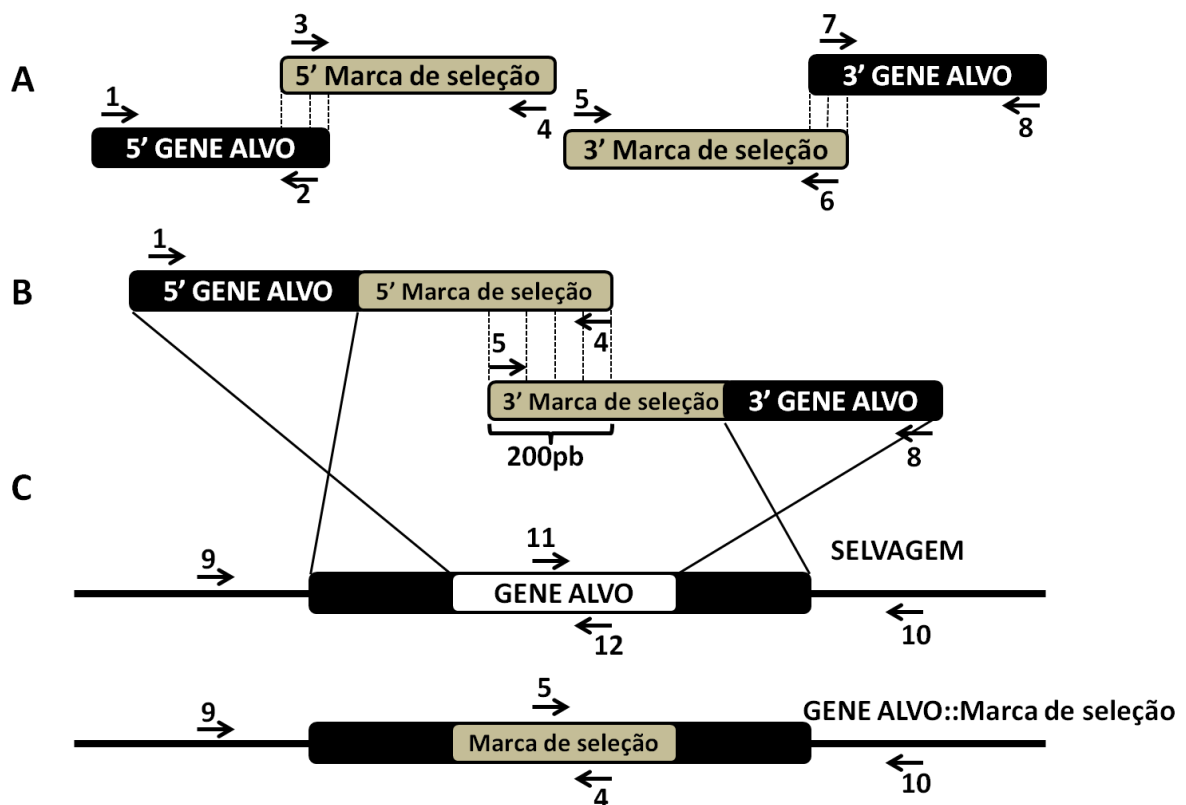
seletivo) e 5 + 8 (5 + 8 – equivalente à região flanqueadora 3' de *VELC* fusionada à região 3' do marcador seletivo). Para o fragmento 1 + 4 fusionado com *HPH*, o tamanho esperado foi de 2,1 Kb. Para o fragmento 5 + 8 fusionado com *HPH*, o tamanho esperado foi de 2,2 Kb. Em contrapartida, para o fragmento 1 + 4 fusionado com *NAT*, o tamanho esperado foi de 1,5 Kb e para o fragmento 5 + 8 fusionado com *NAT*, o tamanho esperado foi de 2,2 Kb. Em seguida, os tamanhos dos amplicons foram checados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Para amplificação dos fragmentos citados foram utilizados os oligonucleotídeos LF220 e LF028 para amplificar o fragmento 1 + 4 cuja marca escolhida foi *HPH*; LF029 e LF228 para amplificar o fragmento 5 + 8 cuja marca escolhida foi *HPH*. Para a marca *NAT*, foram utilizados os oligonucleotídeos LF220 e LF188 para amplificar o fragmento 1 + 4, e para o fragmento 5 + 8, foram utilizados os oligonucleotídeos LF187 e LF228.

Para as quatro reações da segunda etapa do PCR *Double Joint* para a construção do cassete de deleção de *VELC*, foi escolhida a enzima *FideliTaq® DNA Polymerase* (USB) e utilizados os seguintes componentes para cada reação: 1U *FideliTaq® DNA Polymerase*, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de dNTP's, 15 ng de cada fragmento, 1X de tampão e H<sub>2</sub>O até o volume final de 50 µL. O ciclo utilizado para as quatro reações foi:

94 °C por 2 minutos	
94 °C por 30 segundos	} 40 vezes
56 °C por 30 segundos	
68 °C por 4 minutos	
68 °C por 5 minutos	
4°C até o término da reação.	

Em seguida, os fragmentos obtidos foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados com o kit *GFX PCR DNA and Gel band purification Kit* (GE Healthcare) e quantificados para posterior transformação por biobalística.

**Figura 6** - Representação da técnica de PCR *Double Joint*. (A) Os oligonucleotídeos 1 e 2 tem como alvo a região 5' adjacente ao gene alvo enquanto o par 7 e 8 foi utilizado para amplificação da região 3' do mesmo gene, tais amplicons foram obtidos a partir do DNA genômico de KN99 $\alpha$ . As regiões 5' e 3' de *HPH* e *NAT* foram amplificadas usando os pares 3 e 4 e 5 e 6, respectivamente e como molde o plasmídeo pZPHYG para a marca de resistência à Higromicina e pZPNAT para a marca de resistência à Nouseotricina. (B) Fusão dos fragmentos 5' do gene alvo com 5' de *HPH* ou 5' *NAT* e 3' do gene alvo com 3' de *HPH* ou 3' *NAT*, utilizando os primers 1 e 4 para a região 5' e 3 e 8 para a região 3', os moldes utilizados foram os fragmentos 1+2; 3+4; 5+6 e 7+8, os quais foram obtidos na etapa anterior. (C) Os fragmentos 1+4 e 5+8 foram co-transformados em leveduras de *C. neoformans*. As células de KN99 $\alpha$  receberam *HPH* como marca de seleção e as leveduras KN99 $\alpha$  receberam a marca *NAT*. Existe uma região de 200 pb de sobreposição entre os fragmentos 1 + 4 e 5 + 8 que recombinarão *in vivo* após a transformação do fungo.



Fonte: Modificado de Kim *et al.*, 2009a.

### 3.3.2 Transformação de *C. neoformans* por biobalística para obtenção dos mutantes *veA* $\Delta$ e *velC* $\Delta$

Colônias isoladas das linhagens KN99 $\alpha$  e KN99 $\alpha$  de *C. neoformans* foram inoculadas em YPD líquido durante a noite sob agitação a 30 $^{\circ}$  C e no dia seguinte foram lavadas com solução salina para serem inoculadas em placas de YPD+ Sorbitol 1 M a serem transformadas.

Para preparação das partículas (tungstênio M10, diâmetro de 0,7  $\mu$ m, Biorad), com DNA a ser transformado, realizou-se as seguintes etapas: 1. Esterilização das

partículas: pesou-se 30 mg de partículas e adicionou-se 1 mL de etanol 70%. A mistura foi agitada em vortex por 20 minutos, velocidade máxima e centrifugada à velocidade máxima por 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi removido e adicionou-se 1 mL de água ultrapura estéril. O precipitado foi ressuspendido e centrifugado à velocidade máxima por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o processo de lavagem foi repetido outras duas vezes. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e as partículas ressuspendidas em 500 µL de glicerol 50% estéril. 2. Precipitação do DNA a ser transformado nas partículas: as partículas estéreis foram sonicadas por 7 minutos para que desgrumassem e em seguida foram agitadas (velocidade máxima) em vortex por 2 minutos. Acrescentou-se na seguinte ordem: 50 µL de partículas estéreis, 5 µL de DNA (quantidade total variou de 0,5 a 1 µg), 50 µL de CaCl<sub>2</sub> (2,5 M) estéril, 20 µL de espermidina (0,1 M, Sigma) estéril. Essa mistura foi levada ao vortex por 10 minutos, agitação branda e, em seguida, centrifugada por 10 segundos à velocidade máxima. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 150 µL de etanol absoluto às partículas. Centrifugou-se por 10 segundos à velocidade máxima e esse processo foi repetido mais duas vezes. Ao final da última lavagem, adicionou-se uma quantidade de etanol absoluto em volume múltiplo de 4 µL de acordo com a quantidade de placas a serem bombardeadas. As partículas foram sonicadas por 3 segundos, e 4 µL foram imediatamente distribuídos nas membranas carreadoras estéreis já encaixadas nos discos carreadores que, em seguida, foram incubados em sílica, onde permaneceram por pelo menos 30 minutos até o momento do bombardeamento.

Os parâmetros utilizados para a transformação por biobalística (BIOMICS, Brasil) foram: distância de 6 cm do alvo, pressão do gás Hélio a 1.200 psi (são utilizadas 4 membranas de 300 psi para cada tiro) e pressão de vácuo a 27 mmHg. Após o bombardeamento, as placas foram embaladas em papel alumínio e incubadas a 30 °C por 48 h. Após esse período, foram lavadas com YPD líquido e as células inoculadas em placas com meio seletivo, Higromicina B ou Nourseotricina (200 µg/ml, Invitrogen). Após 72 h de incubação a 30 °C os transformantes foram transferidos para uma nova placa de YPD contendo Higromicina B ou Nourseotricina para confirmação da estabilidade da marca de seleção. O DNA genômico dos possíveis transformantes foi extraído conforme protocolo para posterior confirmação via PCR tradicional.

### 3.3.3 Extração do DNA genômico de *C. neoformans* (Smash and Grab)

Para a extração do DNA genômico de *C. neoformans*, células foram cultivadas *durante a noite* em 5 mL de YPD líquido a 30 °C. Após a incubação, as células foram centrifugadas por 6 minutos a 4000 rpm. O precipitado foi ressuscitado em 1,5 mL de água estéril e centrifugado à velocidade máxima durante 5 minutos e seu sobrenadante descartado. Adicionou-se 0,5 mL de fenol:clorofórmio (Bioagency), 0,5 mL de tampão TENTIS (10 mM Tris HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 % Triton X-100, 1 % SDS) e pérolas de vidro (diâmetro:400-600 µm, Sigma). Os tubos foram agitados em vortex por 10 minutos e logo em seguida submetidos à centrifugação por 5 minutos em velocidade máxima. A fase aquosa obtida foi transferida para um novo tubo onde foram adicionados 50 µL de acetato de sódio 3 M e 1 mL de etanol absoluto a fim de precipitar o DNA. O tubo foi agitado e centrifugado em velocidade máxima por 15 minutos e em seguida o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 200 µL de etanol 70 % (v/v) e agitou-se novamente antes de centrifugar novamente por 5 minutos à velocidade máxima. Em seguida, o excesso de álcool foi removido com auxílio de uma pipeta e os tubos foram secados a temperatura ambiente por 5 minutos. O precipitado foi ressuscitado em 50 µL H<sub>2</sub>O ultrapura, acrescida de RNase A (150 µg/mL) e incubou-se os tubos a 37 °C por 1 hora e depois o DNA foi armazenado em freezer (-20 °C).

### 3.3.4 Confirmação da deleção de *VEA* e *VELC*

Para a confirmação da integração do cassete de deleção *VEA::HPH* e *VEA::NAT* no *locus* de *VEA*, foram utilizados oligonucleotídeos desenhados externamente às regiões de *VEA* escolhidas para a construção do cassete de deleção, e combinados com oligonucleotídeos que reconhecem a região do marcador seletivo *HPH* ou *NAT*, conforme a **Tabela 4**. Para as amplificações, foi utilizada a enzima *PyroStart*<sup>™</sup> *Fast PCR* (Fermentas Life Science), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo, LF201 e LF029 para amplificar a região 5' dos mutantes cuja marca de seleção era *HPH*; LF201 e LF187 para amplificar a região 5' dos mutantes cuja marca de seleção era *NAT*. E LF028 e LF222 para amplificar a região 3' dos mutantes cuja marca de seleção era *HPH* e LF188 e LF222 para amplificar a região 3' dos mutantes cuja marca de seleção era *NAT*. Para completar a reação, foram utilizados 10ng de DNA extraído de colônias escolhidas aleatoriamente após a

seleção em sua respectiva marca de seleção e H<sub>2</sub>O ultrapura para completar o volume final para 20 µL. O ciclo utilizado para todas as reações foi:

95 °C por 1 minuto  
 95 °C por 5 segundos  
 59 °C por 10 segundos  
 72 °C por 1 minuto  
 72 °C por 1 minuto  
 4°C até o término da reação.

} 40 vezes

Para a confirmação da integração do cassete de deleção *VELC::HPH* e *VELC::NAT* no *locus* de *VELC*, foram utilizados oligonucleotídeos desenhados externamente às regiões de *VELC* escolhidas para a construção do cassete de deleção, e combinados com oligonucleotídeos que reconhecem a região do marcador seletivo *HPH* ou *NAT*, conforme a **Tabela 4**. Para as amplificações, foi utilizada a enzima *PyroStart™ Fast PCR* (Fermentas Life Science), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo, LF227 e LF029 para amplificar a região 5' dos mutantes cuja marca de seleção era *HPH*; LF227 e LF187 para amplificar a região 5' dos mutantes cuja marca de seleção era *NAT*. E LF028 e LF223 para amplificar a região 3' dos mutantes cuja marca de seleção era *HPH* e LF188 e LF223 para amplificar a região 3' dos mutantes cuja marca de seleção era *NAT*. Para completar a reação, foram utilizados 10 ng de DNA extraído de colônias escolhidas aleatoriamente após a seleção em sua respectiva marca de seleção e H<sub>2</sub>O para completar o volume final para 20 µL. O ciclo utilizado para todas as reações foi:

95 °C por 1 minuto  
 95 °C por 5 segundos  
 59 °C por 10 segundos  
 72 °C por 1 minuto  
 72 °C por 1 minuto  
 4°C até o término da reação.

} 40 vezes

Os tamanhos esperados para a região 5' dos mutantes foram de 2,1 Kb e 1,5 Kb para os mutantes resistentes à Higromicina B e à Nourseotricina, respectivamente. Os tamanhos esperados para a região 3' foram de 2,5 Kb e 2,8 Kb para os mutantes resistentes à Higromicina B e à Nourseotricina, respectivamente.



### 3.3.5 Confirmação dos mutantes *veAaΔ*, *veAαΔ*, *velCaΔ* e *velCαΔ* por *Southern Blot*

Após a confirmação da deleção da ORF de *VEA* e *VELC* nos mutantes, via PCR, realizou-se a confirmação com a técnica de *Southern Blot*.

Para a confirmação de deleção de *VEA* por *Southern Blot*, realizou-se a extração de DNA de alta qualidade e em grande quantidade, por liofilização, conforme Pitkin *et al.*, 1996. Resumidamente, células foram cultivadas *durante a noite*, sob agitação em culturas de 50 mL de YPD líquido a 30 °C. Após a incubação, as células *veAaΔ* e *veAαΔ* foram centrifugadas à temperatura ambiente por 10 minutos, a uma velocidade de 2000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi congelado a -80 °C, durante a noite. As amostras foram liofilizadas por cerca de 10 h, até que adquirisse uma forma bem seca e vaporizada. Após a liofilização, adicionou-se de 3 a 5 mL de pérolas de vidro de 3 mm aos tubos e agitou-se em vortex vigorosamente até que se formasse um pó fino. Foram adicionados 10 mL de tampão CTAB (Tris 100 mM, NaCl 0,7 M, EDTA 10 mM, Brometo de hexadecilmetilamônio 1 % (m/v), 2-mercaptoetanol 1 % (v/v), pH: 7,5), misturou-se gentilmente até que a solução se tornasse uniforme e levemente viscosa. Incubou-se a 65 °C por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados em água corrente e adicionou-se igual volume de clorofórmio. Mais uma vez, misturou-se gentilmente. Os tubos foram centrifugados à velocidade máxima por 10 minutos à temperatura ambiente e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. Adicionou-se igual volume de isopropanol ao sobrenadante e agitou-se gentilmente e centrifugou-se novamente nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol 70 % (v/v). Após esse procedimento, ressuspendeu-se o DNA com água ultrapura acrescida de RNaseA 20 µg/mL. Incubou-se por meia hora a 37 °C e o DNA foi congelado para posterior conferência de integridade via eletroforese em gel de agarose.

Devido à troca do kit *Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System* (GE Healthcare) pelo kit *DIG Wash and Block Buffer Set* (Roche) o processo de extração de DNA genômico por liofilização não foi necessário para que fosse realizado o *Southern Blot* dos possíveis mutantes de *VELC*, utilizando-se então da técnica de extração de DNA por *Smash and Grab*.

### 3.3.5.1 Digestão do DNA genômico e *Southern Blot*

O DNA genômico extraído dos mutantes *veAaΔ* e *veAαΔ* confirmados por PCR foram quantificados e diluídos para a concentração de 2 µg/µL, sendo utilizados 20 µg de DNA para cada digestão com as enzimas selecionadas foram HpaI (New England Biolabs) para os mutantes cuja marca de seleção escolhida foi *HPH* e NcoI (New England Biolabs) para os mutantes cuja marca de seleção foi *NAT*, as reações de digestão foram conduzidas conforme as instruções do fabricante.

A eletroforese foi realizada em TAE 1X (40 mM de tris-acetato, 1 mM EDTA), 0,8 % de agarose e 10 µg de DNA genômico digerido. A sonda também foi aplicada no gel, na quantidade de 10 ng. A voltagem da cuba foi ajustada de acordo com o padrão de 1-5 V por cm<sup>2</sup> da área total do gel. Ao final da corrida, o gel foi fotografado e depurinado (250 mM de HCl) por 10 minutos sob agitação leve. Após este período, a solução foi descartada e uma nova lavagem com tampão de denaturação (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) foi realizada sob agitação leve por 30 minutos. Por fim, foi realizada a lavagem para neutralização do gel com tampão apropriado (NaCl 1,5 M, Trisma Base 0,5 M pH 7,5), por 30 minutos.

Após o tratamento, foi montado um aparato de transferência por capilaridade com recipientes de vidro, papel filtro, SSC 20 X (Citrato de sódio dihidratado 0,3 M, Cloreto de sódio 3 M, pH: 7). O gel foi colocado sobre o papel filtro imerso em SSC 20 X e, sobre ele, foram colocados uma membrana de nylon e várias folhas de papel filtro, de tamanho exatamente igual ao do gel, de mais uma tampa de vidro e de um peso. Assim, o tampão SSC foi capaz de subir por capilaridade pelo papel filtro, passar pelo gel e transferir o DNA para a membrana. A transferência ocorreu durante a noite.

No dia seguinte, aparato foi desmontado e o gel utilizado como molde para marcação de poços na membrana e levado ao transiluminador para que fosse possível conferir a eficiência da transferência. A membrana foi levada ao forno de *cross-link* de modo que a superfície com as amostras ficasse voltada para a luz UV. A membrana foi submetida a 3 pulsos de 1200 J/cm<sup>2</sup>.

A membrana foi hibridizada por meio do kit *Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System* (GE Healthcare). O tampão de hibridização (NaCl 0,5 M, Reagente bloqueador 4 % - 0,125-0,5 mL de tampão por cm<sup>2</sup> de gel) foi

preparado conforme protocolo e levado ao agitador magnético por 1 a 2 horas. Antes de ser utilizado o tampão foi aquecido a 55 °C.

A marcação da sonda foi realizada previamente ao do processo de hibridização em quantidade proporcional ao volume do tampão de hibridização. O fragmento de DNA correspondente (10 ng/ $\mu$ L) foi desnaturado em água fervente separadamente enquanto a solução *cross-linker* do kit foi diluída para 20 % em um volume também proporcional à quantidade de tampão de hibridização em novo tubo. O DNA foi incubado em gelo por 5 minutos e centrifugado por 30 segundos em velocidade máxima. Em seguida, foi adicionado mesmo volume de tampão de reação ao DNA resfriado. Adicionou-se então o reagente de marcação 20 % seguido da diluição da solução *cross-linker*. A mistura foi agitada gentilmente e incubada por 1 hora a 37 °C.

Após esse período foi realizada a pré-hibridização e a hibridização durante a noite com o auxílio de um forno que mantém o movimento contínuo da solução sobre a membrana impedindo a formação de bolhas. A membrana foi colocada dentro do tubo de hibridização, seguida pelo tampão e o tubo foi levado para o forno por 10 minutos a 55 °C para pré-hibridização, assim como o tubo com a sonda marcada. Em seguida, a sonda foi adicionada cuidadosamente ao tampão e a membrana e foram incubados durante a noite.

No dia seguinte o tampão com a sonda marcada foi retirado do tubo e a membrana foi submetida a uma lavagem com tampão primário (Ureia 2 M, SDS 0,1 %, Fosfato de sódio 50 mM pH: 7, NaCl 150 mM, Cloreto de magnésio 1 mM, Reagente bloqueador 0,2 %) por 10 minutos a 55 °C. Após esse período o tampão foi descartado e o processo repetido. A membrana foi então retirada do tubo e levada a um recipiente com tampão de lavagem secundário 1X (Tris base 1 M, NaCl 2 M, pH 10, diluído 1:20 e adicionado de Cloreto de magnésio 2 mM) onde foi agitada, manualmente, à temperatura ambiente, por 5 minutos. Essa etapa também foi repetida.

Após as lavagens, a membrana foi preparada com detector do kit (30-40  $\mu$ L de detector/ $\text{cm}^2$ ) por 5 minutos e embalada em papel filme. Em seguida, foi colocada no cassete de revelação. O processo de revelação foi realizado na ausência de luz, com exceção de uma luz infravermelha como única fonte de iluminação. O filme de revelação foi colocado no cassete e deixado para sensibilização durante a noite. Finalmente, o filme foi retirado do cassete e imerso em solução reveladora e

fixadora, respectivamente, até que o resultado estivesse satisfatório. Ao final, o filme foi lavado em água destilada e submetido à análise.

Para a confirmação da deleção de *VELC* por *Southern Blot*, o DNA genômico das células *vel/CaΔ* e *vel/CαΔ*, confirmadas por PCR, foim extraído conforme a técnica de *Smash and Grab*. Em seguida, o DNA foi quantificado e diluído para a concentração de 2 µg/µL, sendo utilizados 10 µg de DNA para cada digestão. As enzimas escolhidas foram *NcoI* (New England Biolabs) para os mutantes cuja marca de seleção escolhida foi *HPH* e *SphI* (New England Biolabs) para os mutantes cuja marca de seleção foi *NAT*, as digestões foram realizadas conforme as instruções do fabricante.

As condições para eletroforese da digestão e transferência foram as mesmas utilizadas para o *Southern Blot* de *VEA*. Porém, para a hibridização da membrana e detecção, foram utilizados os protocolos do kit *DIG Wash and Block Buffer Set* (Roche).

Foi realizada a PCR da sonda (fragmento 1 + 2) para incorporação do marcador DIG (digoxigenina) do gene *VELC* de *C. neoformans* tendo como DNA molde o DNA genômico de *KN99a*, para tal, foi utilizado o kit *PCR DIG Probe Synthesis Kit* (Roche) com os oligonucleotídeos LF220 e LF229, também foi feita a mesma PCR utilizando a *OneTaq® DNA Polymerase* (New England Biolabs) com a finalidade de observar se o amplicon da sonda possuía um tamanho molecular um pouco maior que o amplicon gerado por PCR comum, tendo em vista que a sonda deveria incorporar a cauda de DIG. O ciclo utilizado foi constituído de:

94 °C por 2 minutos	} 45 vezes
94 °C por 30 segundos	
60 °C por 30 segundos	
68 °C por 1 minuto	
68 °C por 5 minutos	
4°C até o término da reação.	

A membrana foi hibridizada com *DIG Easy Hyb Granules* (Roche), sendo que o tampão de hibridização fora adicionado à membrana em forno de hibridização para que fosse realizada a etapa de pré-hibridização e equilíbrio da temperatura do tampão. A marcação da sonda foi realizada conforme descrito anteriormente com o auxílio do kit *PCR DIG Probe Synthesis Kit* (Roche) e a hibridização ocorreu durante a noite.

Após esse período, a solução foi retirada e a membrana foi lavada duas vezes com a solução WASH 1 (2X SSC, 0,1% SDS) por 5 minutos. Em seguida foi feita a lavagem duas vezes com a solução WASH 2 (0,05X SSC, 0,05% SDS) por 15 minutos durante a noite.

Com o auxílio do *DIG Wash and Block Buffer Set* (Roche) foram feitos o preparo e bloqueio da membrana. Inicialmente, a membrana foi lavada com *DIG Washing Buffer* por 5 minutos. Após, a membrana foi bloqueada com a mistura da solução de bloqueio com o tampão de ácido málico por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado o anticorpo contra DIG e o mesmo foi incubado com a membrana por 30 minutos em agitação. Ao final, a membrana foi lavada duas vezes com *DIG Washing Buffer* por 15 minutos. Findo este período, a membrana foi incubada em saco plástico com o detector para prosseguir o processo de sensibilização do filme e revelação.

Em seguida, foi colocada no cassete de revelação. O processo de revelação foi realizado em ausência de luz, com exceção de uma luz infravermelha como única fonte de iluminação. O filme de revelação foi colocado no cassete e deixado para sensibilização durante a noite. Finalmente, o filme foi retirado do cassete e imerso em solução reveladora e fixadora, respectivamente, até que o resultado estivesse satisfatório. Ao final, o filme foi lavado em água destilada e submetida à análise.

### 3.4 Reconstituição do locus de VEA e VELC

Alguns dos procedimentos utilizados nessa etapa são os mesmos descritos anteriormente para obtenção dos mutantes *veAaΔ*, *veAαΔ*, *ve/CaΔ* e *ve/CαΔ*. Inicialmente, amplificou-se o locus VEA (2,2 kb) e VELC (2,8 kb) via PCR utilizando-se os oligonucleotídeos LF255 e LF256; LF289 e LF290, respectivamente (**Tabela 4**) com a enzima *Phusion* (Thermo Scientific) no volume final de 50 μL (1X de HF Buffer, 0,2 mM de dNTP's, 0,5 μM de cada oligonucleotídeo de seu respectivo gene, 10 ng DNA genômico de KN99a e água ultrapura). O ciclo utilizado para a amplificação para ambos os fragmentos foi:

95 °C por 1 minuto	} 40 vezes
95 °C por 30 segundos	
60 °C por 30 segundos	
72 °C por 4 minutos	
72 °C por 5 minutos	

4°C até o término da reação.

Os fragmentos correspondentes a cada um dos genes foi eluído do gel de agarose 0,8 % com auxílio do kit *GFX PCR DNA and Gel band purification Kit* (GE Healthcare) e, em seguida, quantificados no Genequant®. Em seguida, 3 µg do fragmento foi misturado ao plasmídeo pJAF (5,8 kb, que confere resistência à Neomicina), na proporção molar de 3:1 (fragmento de interesse: plasmídeo) para serem co-transformados nos mutantes *veAΔ* de *C. neoformans*, a fim de restaurar o gene e aos mutantes *veICΔ* para a mesma finalidade.

A preparação de partículas e o procedimento de biobalística ocorreram conforme descrito anteriormente. O vetor pJAF possui a marca de seleção para neomicina/geneticina, assim a seleção dos transformantes foi realizada em YPD + geneticina na concentração de 200 µg/mL.

O DNA genômico das colônias obtidas foi extraído conforme descrito anteriormente. A confirmação da reconstituição do *locus* de *VEA* foi realizada por meio de amplificação da região 5' *VEA* e da região 3' *VEA* das cepas que foram capazes de crescer em geneticina e incapazes de crescer na presença de Higromicina B ou Nourseotricina. Foi feita PCR com os oligonucleotídeos LF231 e LF186 para confirmação da região 5', cujo tamanho esperado foi 2,1 Kb. E LF185 e LF222 para confirmação da região 3' e o tamanho esperado foi de 1,8 Kb (**Tabela 4**).

Para amplificação das regiões 5' e 3' de *VEA*, foram feitas reações de volume final 20 µL com a enzima *PyroStart*<sup>TM</sup> Fast PCR (Fermentas Life Science) (10 ng DNA genômico, *PyroStart*<sup>TM</sup> Fast PCR mix 2X, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo (*forward* e reverso) e água ultrapura até o volume final de 20 µL). O ciclo utilizado foi:

95 °C por 1 minuto	
95 °C por 5 segundos	} 40 vezes
54 °C por 30 segundos	
72 °C por 1:30 minutos	
72 °C por 1 minuto	
4°C até o término da reação.	

O mesmo processo de confirmação de reconstituição foi realizado com os possíveis reconstituídos de *VELC*, porém os oligonucleotídeos utilizados para a confirmação foram LF227 e LF224 para confirmação da região 5', cujo tamanho

esperado foi 2,1 Kb. E LF233 e LF223 para confirmação da região 3' e o tamanho esperado foi de 1,9 Kb (**Tabela 4**).

Para amplificação das regiões 5' e 3', foram feitas reações de volume final 20  $\mu$ L com a enzima *PyroStart*<sup>TM</sup> Fast PCR (Fermentas Life Science) (10 ng DNA genômico, Pyro Fast mix 2X, 0,5  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo (forward e reverso) e água H<sub>2</sub>O até o volume final de 20  $\mu$ L). O ciclo utilizado foi:

95 °C por 1 minuto	
95 °C por 5 segundos	} 40 vezes
54 °C por 30 segundos	
72 °C por 1:30 minutos	
72 °C por 1 minuto	
4°C até o término da reação.	

### 3.5 Avaliação fenotípica *in vitro* dos mutantes *veA* $\Delta$ e *velC* $\Delta$

Mutantes *veA* $\Delta$  e *velC* $\Delta$  foram inoculados em 5 mL de meio YPD e incubados durante a noite a 30 °C sob agitação para crescimento. Após o crescimento as células foram centrifugadas e lavadas com solução salina e ressuspendidas em 1 mL de água estéril. As amostras foram diluídas 1:100 para contagem na Câmara de Neubauer. Para a realização dos testes fenotípicos estabeleceu-se a concentração inicial padrão de  $1 \times 10^7$  células/mL. A partir da concentração padrão foram realizadas diluições seriadas até a concentração de  $1 \times 10^3$  células/mL. Os testes de fenótipo em condições de estresse de parede, estresse térmico, estresse osmótico e estresse oxidativo foram realizados por meio de diluição seriada, plaqueando-se *spots* de 10  $\mu$ L de cada uma das diluições. Para os testes qualitativos de produção de melanina, cápsula, urease e fosfolipase foram utilizadas uma única diluição. Como controle, foi utilizada a cepa selvagem KN99 $\alpha$  e a cepas reconstituídas de seu respectivo mutante foram utilizadas para a confirmação de que aquele fenótipo observado fora recuperado por meio da reintegração do gene ao *locus*.

Para os testes de fusão e acasalamento (*mating*), foram realizados cruzamentos entre os tipos sexuais opostos de cada cepa (selvagem mutante e reconstituído) através de co-cultivo das cepas conforme a necessidade.

### 3.5.1 Estresse térmico

As leveduras foram plaqueadas em meio YPD sólido (acrescido de 2% de ágar bacteriológico) em conjunto com linhagens selvagens para controle e incubadas a 30 e 37 °C por 48-72 h.

### 3.5.2 Síntese de melanina

A produção de melanina foi avaliada por meio do inóculo  $1.10^5$  das leveduras selvagens e mutantes e reconstituídas em meio L-DOPA e submetidas a crescimento a 30 °C por até 7 dias.

### 3.5.3 Produção de cápsula

A produção de cápsula foi avaliada por meio de plaqueamento de  $1.10^5$  das leveduras selvagens e mutantes e reconstituídas em placas de meio DMEM acrescido de MOPS (Gilbert *et al.*, 2010). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por até 72 horas, posteriormente, uma fração da colônia foi ressuspensa em 20 µL de água destilada estéril e foi realizada a visualização das células microscopicamente com tinta nanquim. Utilizou-se microscópio *Zeiss Axio Observer Z1*, sendo que as imagens foram captadas em DIC.

### 3.5.4 Produção de urease

A produção de urease foi avaliada após incubação de  $1 \times 10^3$  células de levedura em meio *Christiansen's Urea Agar* a 30 °C por 48-72 h.

### 3.5.5 Produção de fosfolipase

A capacidade de sintetizar fosfolipase foi avaliada após incubação de  $1 \times 10^4$  células de levedura em meio de emulsão de gema a 30 °C por 48 horas. Em seguida, os halos opacos formados pelas colônias foram aferidos com auxílio de uma régua e a razão diâmetro da colônia/diâmetro da colônia e halo, de cada uma das cepas, foi comparada.

### 3.5.6 Integridade da parede celular

A determinação de possíveis defeitos na síntese de parede celular dos mutantes *veA $\alpha$  $\Delta$*  e *ve/C $\alpha$  $\Delta$*  foi realizada após o inóculo de leveduras crescidas em YPD ágar, acrescido de 0,5 % e 1 % de *Congo Red* e incubadas a 30 e 37 °C



durante 48-72 h, visto que linhagens que apresentam defeito na constituição e organização da parede celular apresentam dificuldade de crescimento nesse meio de cultura (Roncero & Durán, 1985).

Testes fenotípicos com outros agentes estressores de parede também foram realizados adicionando-se ao meio YPD sólido: SDS (0,05 %), cafeína (0,5 mg/mL e 1 mg/mL) e Calcofluor *White* (0,5 mg/mL e 1,5 mg/mL). As placas foram incubadas a 30 e 37 °C durante 48-72 h.

### 3.5.7 Estresse oxidativo

O efeito de agente oxidativo sobre os mutantes *veA $\alpha$*  $\Delta$  e *ve/C $\alpha$*  $\Delta$  foi testado em meio YPD, acrescido peróxido de hidrogênio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (0,5 mM e 1 mM). As placas foram incubadas a 30 °C durante 48-72 h.

### 3.5.8 Estresse osmótico

O efeito de agentes osmóticos sobre os mutantes *veA $\alpha$*  $\Delta$  e *ve/C $\alpha$*  $\Delta$  foi testado em meio YPD, acrescido de NaCl e KCl 1,5 M e Sorbitol 2 M. Em ambos os testes as placas foram incubadas a 30 e 37 °C durante 48-72 h.

### 3.5.9 Teste de resistência à luz UV

A capacidade de crescimento após a irradiação com luz UV também foi testada a fim de verificar se *VEA* e *VELC* participam na resistência ou hipersensibilidade à luz UV, haja vista que mutantes *BWC1* de *C. neoformans*, além de acasalaram na presença de luz, os mesmos possuem resistência à luz UV.

As células foram irradiadas com doses de 10 a 50 mJ/cm<sup>2</sup> de luz UV com o auxílio do UV Crosslinker- FB-UVXL-1000 em placas de YPD Agar contendo as diluições seriadas das linhagens selvagem, mutante e reconstituída de *VEA* e *VELC*.

### 3.5.10 Crescimento em meios com diferentes concentrações de nitrogênio

Analisou-se a capacidade de crescimento das cepas selvagem, mutante e reconstituída em diferentes meios de cultura: SLAD, SMAD e SHAD, cujas concentrações de nitrogênio variam de 5  $\mu$ M a 5 mM. O meio YPD foi utilizado como controle de crescimento.

### 3.5.11 Teste de Fusão

A fim de verificar se os mutantes de *VEA* e *VELC* possuíam defeito na fusão celular, as células foram cultivadas *durante a noite* a 30 °C sob agitação e no dia seguinte, foi realizado o co-cultivo a partir de uma suspensão de células na concentração padrão de  $1 \times 10^7$  células por mL.

*Spots* de 5 µL dos cruzamentos entre os selvagens KN99 $\alpha$  e KN99 $\alpha$ , *veAa*Δ e *veAa*Δ ou *ve/Ca*Δ e *ve/Ca*Δ foram plaqueados em meio MS na ausência e na presença de luz branca, tendo como fonte de luz a lâmpada fluorescente FO 32 W/640 (OSRAM). As placas foram incubadas por 24 horas, os cruzamentos foram cortados do meio e os mesmos foram depositados em falcons contendo 2 mL de água destilada estéril. Os cruzamentos foram recuperados por meio de homogeneização vigorosa em vórtex. Alíquotas de 200 µL de cada cruzamento foram plaqueados em meio YPD contendo 200 µg/mL de Higromicina B e Nourseotricina e incubadas em estufa a 30 °C. Após 3 a 5 dias foi possível observar a presença das células que sofreram fusão.

### 3.5.12 Acasalamento

Foi avaliada a capacidade das leveduras haploides de realizarem acasalamento (quando em contato com o tipo sexual oposto) em meio Filament Agar, meio Murashige and Skoog (MS) e meio SLAD.

As leveduras cresceram *durante a noite* a 30 °C sob agitação e, no dia seguinte, foi feito o co-cultivo de acordo com os cruzamentos desejados a partir de uma suspensão padrão de  $1 \times 10^7$  células/mL. Para cada cruzamento foi plaqueado um *spot* de 5 µL. As placas foram incubadas à temperatura ambiente, no escuro ou na presença de luz branca, por cerca de 10 dias e observadas e fotodocumentadas diariamente em microscópio para o aparecimento de hifas indicativas de acasalamento.

### 3.5.13 Análise microscópica das hifas dos cruzamentos de selvagens e mutantes de VEA e VELC

Foi realizada a microscopia para análise morfológica dos cruzamentos KN99 $\alpha$  vs. KN99 $\alpha$ , *veAa*Δ vs. *veAa*Δ; *ve/Ca*Δ vs. *ve/Ca*Δ, além de contraste diferencial de fase (DIC) e fluorescência dos cruzamentos selvagens e mutantes *vel/vel*. O

microscópio de fluorescência *Zeiss Axio Imager.A1* adaptado com câmera digital *Axio Cam MRM* foi utilizado para esses experimentos.

Pequenas fatias de ágar da periferia do *spot* de cada cruzamento de interesse foram cortadas e prensadas contra lâminas para análise morfológica de hifas.

#### 3.5.13.1 Coloração das hifas dos cruzamentos de selvagens e mutantes de *VEA* e *VELC*

Os *spots* de cruzamentos em meio MS foram removidos das placas originais e depositados em placas de cultura de células. Cada um dos cruzamentos foi lavado com 5 mL de PBS estéril por 10 minutos, sob agitação leve. Em seguida, adicionou-se 5 mL de etanol 70 % e incubou-se a placa por 12 minutos, sob agitação leve. As amostras foram lavadas novamente com 5 mL PBS sob agitação por 10 minutos e permeabilizadas com 5 mL de PBS + 1 % Triton X-100 por 10 minutos. As amostras foram novamente lavadas com PBS e em seguida adicionou-se 5 mL de PBS contendo 10 µL de Calcofluor *White* (para corar a parede celular) e 1 µL de *sytox Green* (para corar o núcleo) para incubação da placa por 15 minutos sob agitação leve. Nessa etapa a placa foi coberta com papel alumínio para preservar os corantes. Após essa incubação, as amostras foram lavadas com PBS e preparadas para observação conforme descrito para análise morfológica.

#### 3.6 Avaliação da Sobrevivência *in vitro* dos mutantes *veA*Δ e *velC*Δ

Foi avaliada a capacidade dos selvagens, mutantes e reconstituídos de sobreviverem à fagocitose conforme protocolo adaptado de Cox e colaboradores (2003). A partir de uma cultura saudável de macrófagos J774.A1 (não confluentes e de número de passagem inferior a dez), as células foram descoladas da garrafa com auxílio da solução *Cell Dissociation Solution* (SIGMA) e a suspensão de células foi centrifugada a 200 g por 5 minutos à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi descartado e os macrófagos foram ressuspensos em 1 mL de DMEM + SFB 10 %. Uma alíquota de macrófagos foi diluída 1:10 em PBS contendo azul de tripano (estoque 10X) e as células não coradas foram contadas em um hematocítômetro de modo a abranger apenas as células viáveis.

Ajustou-se a concentração de macrófagos para  $5 \times 10^5$  células/mL em meio DMEM + SFB 10 % contendo ampicilina a 50 µg/mL e estreptomicina a 100 µg/mL.

O volume final da suspensão foi calculado de acordo com o número de poços a serem usados.

Em uma placa de 96 poços estéril, foi aplicado 100 µL da suspensão por poço. Fez-se três replicatas para cada condição e cepa, além de três poços para o controle negativo que não receberam células fúngicas. A placa foi incubada durante a noite a 37 °C e CO<sub>2</sub> a 5 %. Nesse mesmo dia, as cepas de interesse de *C. neoformans* foram inoculadas em meio YPD e incubadas sob agitação, 200 rpm, durante a noite, a 30 °C.

No dia seguinte, as células fúngicas foram lavadas com PBS estéril, contadas e diluídas em meio DMEM, em uma concentração de 1x10<sup>6</sup> células/mL, tendo como razão de infecção 1:5 (macrófago: levedura). O anticorpo anti-GXM 18B7 foi adicionado à suspensão fúngica em uma concentração final de 10 µg/mL, de modo à opsonizá-las.

A placa com macrófagos foi inspecionada em um microscópio e levada para o fluxo onde o meio velho foi retirado. A suspensão de células fúngicas e anticorpo foram distribuídos em cada um dos poços em novas alíquotas de 100 µL.

Em seguida, a placa foi centrífugada por 10 minutos, 200 g e incubada a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> por 2 horas, para permitir que ocorresse o processo de fagocitose. Em seguida, o meio foi retirado da placa e cada um dos poços foi lavado cuidadosamente com PBS estéril. Novas alíquotas de 100 µL de meio DMEM + SFB 10 % foram distribuídas entre os poços e a placa foi incubada durante a noite na estufa a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, a placa foi inspecionada quanto à presença de contaminantes e o meio de cultura contendo *C. neoformans* não-fagocitados, que sofreram vomocitose ou que saíram dos macrófagos causando a lise dos mesmos, foi recolhido e armazenado em um microtubo estéril. Os macrófagos remanescentes na placa foram lisados com auxílio de uma solução de SDS 0,5 %. A suspensão da lise foi recolhida. O lisado celular foi diluído 1:100 em PBS estéril e inoculado, para cada replicata, 100 µL da diluição em meio YPD sólido. As placas foram incubadas a 30 °C por um período de até 48 horas. As UFC's (Unidades formadoras de colônia) de cada replicata foram contadas para avaliar a taxa de sobrevivência das cepas no interior dos macrófagos. Esse experimento foi realizado em replicatas experimentais e biológicas. Os resultados foram analisados com auxílio do software GraphPad Prism 5.

### 3.7 *Análise da interação dos velvets de C. neoformans–Duplo-Híbrido*

A fim de verificar a possível interação dos *velvets* VEA, VELB, VELC e VOSA, ensaios de duplo-híbrido foram conduzidos utilizando o kit *Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System* (Clontech).

#### 3.7.1 Extração de RNA e síntese do cDNA

Foi preparada uma cultura de 24 horas da cepa H99 em crescimento vegetativo ( $OD_{600}$  menor do que 1.0) pela semeadura de uma colônia jovem grande em 200 mL de YPD líquido em um frasco cônico de 500 mL, seguida de incubação a 30 °C por 24 horas a 150-200 rpm.

A cultura foi dividida em tubos de polipropileno estéreis de 50 mL, o meio foi removido por centrifugação, o precipitado celular foi ressuscitado em água pré-tratada com DEPC, a suspensão foi centrifugada novamente e a água foi removida. O precipitado foi congelado imediatamente pela imersão dos tubos em nitrogênio líquido.

Os tubos foram liofilizados por uma noite, após o que se adicionaram 5 mL de pérolas de vidro de 3 mm de diâmetro. O material foi agitado vigorosamente à mão até que se reduzisse a um pó fino.

Em gabinete de biossegurança, os tubos foram abertos e se adicionaram, a cada um, 4 mL de reagente TRI reagente (Life Technologies) que tenha sido trazido previamente para a temperatura ambiente, a que se seguiu nova agitação vigorosa. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 5 minutos.

Adicionaram-se 800  $\mu$ L de clorofórmio a cada tubo, que foi então fechado e agitado vigorosamente à mão por trinta segundos.

Transferiram-se as amostras para tubos de polipropileno de 15 mL com tampa, e no total se deixaram-nas por 3 minutos à temperatura ambiente.

Centrifugaram-se os tubos por 15 minutos a 12.000 *g* a 4 °C num rotor de ângulo fixo pré-resfriado e então a fase aquosa de cada tubo foi cuidadosamente transferida para um tubo novo idêntico ao anterior por pipetagem (ponteiras de 1 mL).

A cada tubo se adicionaram 2 mL de 2-propanol, ele foi fechado e invertido algumas vezes para misturar a suspensão. Os tubos foram então incubados por 10 minutos à temperatura ambiente.

Centrifugaram-se os tubos a 12.000 *g* por 10 minutos a quatro graus em rotor de ângulo fixo.

O sobrenadante foi decantado e o precipitado, lavado pela adição seguida de mistura por inversão de etanol a 75% (feito em água tratada com DEPC).

Decantou-se o etanol cuidadosamente, os restos de líquido foram removidos por pipetagem e os tubos, secos ao ar invertidos sobre papel absorvente.

Cada precipitado foi acrescido de 500 µL de água tratada com DEPC e solubilizado pela incubação dos tubos a 55 °C por 10 minutos.

O RNA foi alíquotado, uma amostra foi submetida à verificação de integridade e quantificação por meio de um bioanalisador (Agilent Technologies, de acordo com as instruções do fabricante para o sistema RNA Nano6000). As alíquotas foram congeladas a -80 °C.

O cDNA foi gerado a partir do RNA obtido na extração. Não foi feito o tratamento com DNase. Foi utilizado o *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription*® (Applied Biosystems) e o procedimento foi conduzido conforme instruções do fabricante. Para transcrição reversa, foram utilizados 2 µg de RNA para a reação cujo volume final foi de 20 µL (0,8 µL de 25 X dNTPs mix, 2 µL de 10 X RT Buffer, 2 µL de RT *Random Primers*, 1 µL de Multiscribe Reverse Transcriptase, 1 µL de Inibidor de RNase, 3,2 µL de água H<sub>2</sub>O *RNase-free*). O ciclo utilizado foi:

25 °C por 10 minutos

37 °C por 120 minutos

85 °C por 5 segundos

4 °C até o fim da reação.

### 3.7.2 Desenho de oligonucleotídeos para duplo-híbrido

Foram desenhados no mínimo dois pares de oligonucleotídeos para cada gene *velvet* tendo como referência as sequências dos transcritos dos mesmos, no caso de *VEA*, foi utilizada a nova anotação do gene. O primeiro par serviu para que o gene alvo fosse amplificado a partir do cDNA de H99 (*C. neoformans* var. *neoformans* - Sorotipo A) e o mesmo possuía nas extremidades uma região de homologia ao plasmídeo pGBKT7 linearizado por EcoRI e BamHI, para que isso facilitasse a clonagem pelo sistema de recombinação *In-Fusion*® *HD*

*EcoDry™ Cloning Kit* (Clontech). Para o desenho dos oligonucleotídeos da presa, foi adicionado uma região de homologia ao plasmídeo pGADT7 linearizado por *Sma*I.

### 3.7.3 Amplificação dos cDNAs dos *velvets* de *C. neoformans*

Os fragmentos de transcritos para as iscas e presas de *VEA*, *VELB*, *VELC* e isca de *VOSA*, foram gerados a partir por PCR comum tendo como molde o cDNA de H99. Tais reações de PCR foram realizadas com a enzima Phusion (Thermo Scientific).

Para a produção dos fragmentos das iscas e presas de *VEA*, *VELB*, *VELC* e *VOSA*, foi utilizado 1 µL da reação de cDNA diretamente em cada reação de PCR convencional, cujo objetivo foi isolar os fragmentos dos genes em investigação. Os oligonucleotídeos utilizados estão listados na **Tabela 4** do presente estudo.

Para a obtenção dos fragmentos da isca de *VEA*, foi realizada uma PCR com os iniciadores LF298 e LF300. O fragmento correspondente à presa de *VEA* foi obtido por meio de PCR comum com os oligonucleotídeos LF306 e LF307. Para todas as reações foi utilizado o mesmo ciclo de dois passos, no qual foi constituído de:

98 °C por 30 segundos	} 40 vezes
98 °C por 10 segundos	
72 °C por 1:20 minutos	
72 °C por 5 minutos	
4°C até o término da reação.	

Os amplicons esperados de *VEA* foram de 1,6 Kb.

Para a obtenção do fragmento da isca de *VELB*, foram utilizados os oligonucleotídeos LF328 e LF329. Para o amplicon referente à presa foram utilizados os oligonucleotídeos LF315 e LF316, o ciclo utilizado para ambas as reações foi:

98 °C por 30 segundos	} 5 vezes
98 °C por 10 segundos	
60,1 °C por 30 segundos	
72 °C por 1:30 minutos	} 40 vezes
98 °C por 5 segundos	
72 °C por 1:30 minutos	
72 °C por 5 minutos	

4°C até o término da reação.

Os amplicons esperados de *VELB* foram de 1,7 Kb.

Para a obtenção dos fragmentos da isca de *VELC*, foram utilizados os oligonucleotídeos LF301 e LF303. Para a presa de *VELC*, foram utilizados os oligonucleotídeos LF310 e LF311. Para ambos os fragmentos, foi utilizada uma PCR comum de três passos, no qual o ciclo utilizado foi:

98 °C por 30 segundos	
98 °C por 10 segundos	} 5 vezes
60,2 °C por 30 segundos	
72 °C por 1 minuto	
98 °C por 5 segundos	} 40 vezes
72 °C por 1:30 minutos	
72 °C por 5 minutos	

4°C até o término da reação.

O tamanho esperado para os amplicons de *VELC* foi de 1,5 Kb.

Para a obtenção do fragmento da isca de *VOSA*, foram utilizados os oligonucleotídeos LF317 e LF336. Para a amplificação do fragmento de *VOSA* isca foi utilizado o ciclo:

98 °C por 30 segundos	
98 °C por 10 segundos	} 40 vezes
72 °C por 1:30 minutos	
72 °C por 5 minutos	

4°C até o término da reação.

Os amplicons esperados de *VOSA* foram de 1,9 Kb.

#### 3.7.4 Clonagem dos genes de interesse, transformação e recuperação do plasmídeo

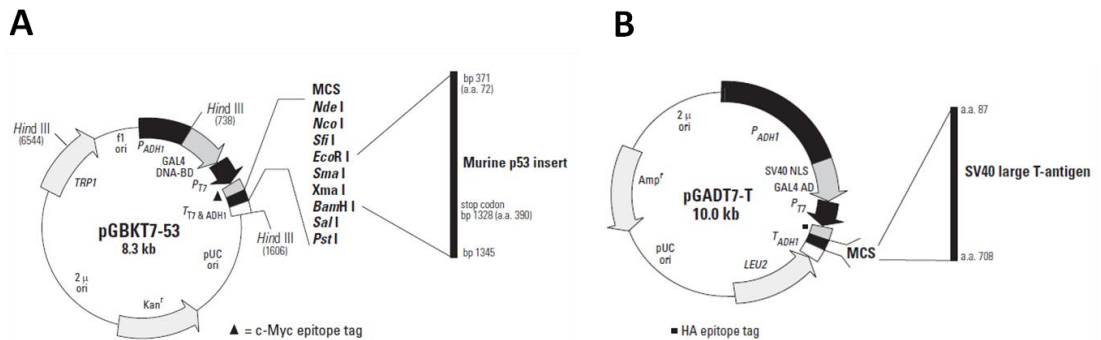
A clonagem dos insertos se deu por meio do kit *In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kit*. Onde, 100 ng do plasmídeo de interesse (pGBKT7 para a isca e pGADT7 para a presa) (**Figura 7**) e 100 ng de seu inserto correspondente, em um volume final de 10 µL, foram colocados em um tubo do kit e homogeneizados por meio de pipetagem. Em seguida, os tubos foram incubados em termociclador num ciclo constituído de:

37 °C por 15 minutos



50 °C por 15 minutos  
4°C até o término da reação.

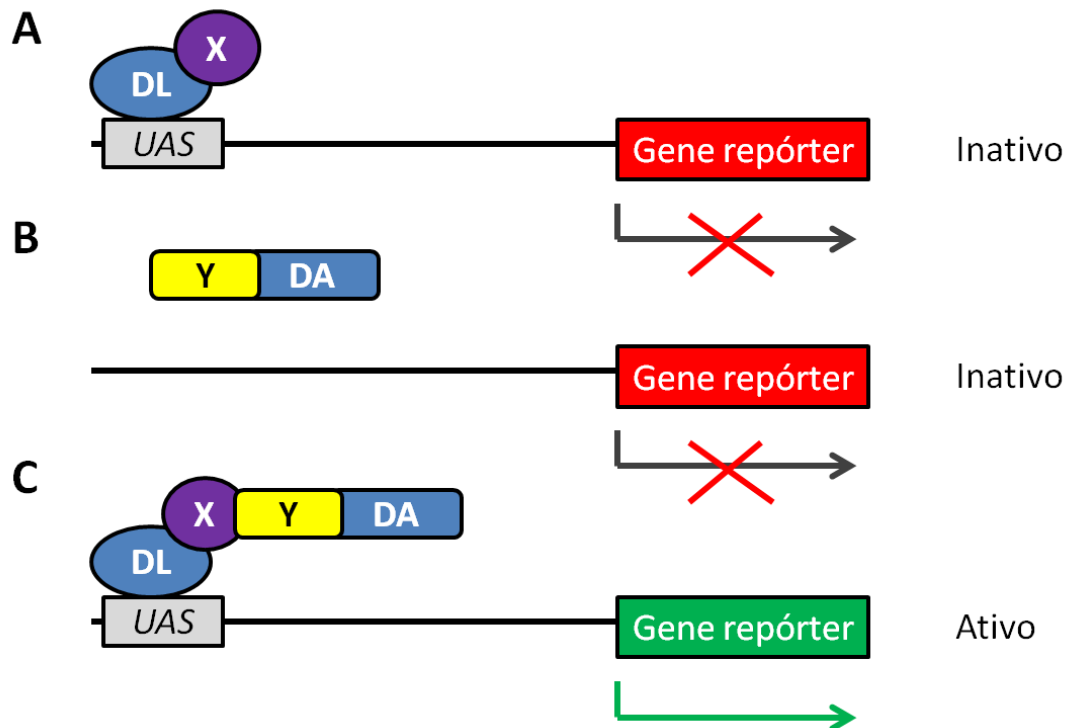
**Figura 7** - Mapas dos plasmídeos utilizados no ensaio de duplo-híbrido. (A) Mapa do plasmídeo pGBKT7 utilizado para clonar as iscas. (B) Mapa do plasmídeo pGADT7 utilizado para clonar as presas.



Fonte: Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech).

O duplo-híbrido se trata de um teste de interação entre proteínas. O transcrito do gene alvo é clonado num vetor que possui um promotor específico, no nosso caso, *GAL4*. O gene fusionado aos domínios de ligação e ativação de *GAL4* somente ativam o gene repórter quando ocorre a interação entre as proteínas (Ferro & Trabalzini, 2013) (**Figura 8**).

**Figura 8** - Esquema do funcionamento do teste de duplo-híbrido. **(A)** O transcrito do gene X fusionado ao domínio de ligação (DL). **(B)** Transcrito do gene Y fusionado ao domínio de ativação (DA). **(C)** Interação entre as proteínas X e Y e transativação do gene repórter.



Fonte: Adaptado de: Ferro & Trabalzini, 2013.

O transcrito do gene X fusionado ao domínio de ligação (DL) é incapaz de ativar o gene repórter sem a presença do domínio de ativação (**Figura 8a**), o mesmo processo ocorre se o domínio de ativação fusionado ao transcrito do gene Y não estiver interagindo com a proteína codificada pelo transcrito do gene X (**Figura 8b**). A ativação do repórter ocorre somente na célula que contém a interação das proteínas X e Y formando um complexo que se liga ao promotor (**Figura 8c**).

Para a replicação dos plasmídeos com os insertos de interesse, foi realizada a transformação de *E. coli* competentes *Stellar*<sup>TM</sup> (Clontech) por choque térmico, conforme o protocolo do fabricante. Em seguida, as células transformadas foram plaqueadas em meio LB Agar acrescido da droga a qual o plasmídeo conferia resistência (Canamicina para pGBKT7 e Ampicilina para pGADT7) e incubadas a 37 °C por 16 horas. Decorridas às 16 horas, foram escolhidas colônias aleatórias e as mesmas foram inoculadas em meio LB líquido para posterior extração do DNA plasmidial que fora extraído com o auxílio do kit *Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare) conforme as instruções do fabricante. Após a extração, 5 µL de

cada DNA plasmidial foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% e quantificado para posterior transformação das células de *S. cerevisiae*.

Foi realizada a confirmação da clonagem do inserto em seus respectivos vetores por meio de PCR de dois passos, utilizando os mesmos oligonucleotídeos necessários para o isolamento do cDNA dos genes-alvo. O ciclo utilizado foi constituído de:

98 °C por 30 segundos  
 98 °C por 10 segundos  
 72 °C por 1:20 minutos } 40 vezes  
 72 °C por 5 minutos  
 4°C até o término da reação.

Os amplicons foram confirmados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, os quais deviam possuir os tamanhos de 1,6 Kb para *VEA*; 1,7 Kb para *VELB*; 1,5 Kb para *VELC* e 1,9 Kb para *VOSA*.

### 3.7.5 PCR do sistema de recombinação e PCR de colônia dos plasmídeos de *VELC* (presas)

Devido à ausência de amplicons nos plasmídeos da presa de *VELC* escolhidas anteriormente, foi realizada a PCR do sistema de recombinação utilizando os oligonucleotídeos usados para o isolamento do cDNA de *VELC* e concomitantemente foi realizada PCR de colônia das bactérias transformantes que não haviam sido escolhidas anteriormente com a enzima *PyroStart*<sup>TM</sup> Fast PCR (Fermentas Life Science). Para ambas as reações de amplificação, o ciclo realizado foi o seguinte:

95 °C por 1 minuto  
 95 °C por 5 segundos  
 72 °C por 1 minuto } 40 vezes  
 72 °C por 1 minuto  
 4 °C até o fim da reação.

O amplicon foi confirmado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% no qual devia possuir o tamanho de 1,5 Kb.

### 3.7.6 Confirmação da clonagem por meio de PCR dos plasmídeos

Além da primeira confirmação da clonagem por PCR utilizando os amplicons do isolamento do cDNA, foi realizada uma segunda confirmação com a enzima *Phusion* (Thermo Scientific) a fim de verificar se os insertos haviam entrado corretamente no plasmídeo. Para tal, foi utilizado o oligonucleotídeo T7 com o oligonucleotídeo reverso utilizado para o isolamento do cDNA de seu respectivo *velvet*. Para as reações de *VEA* (isca e presa) e *VOSA* (isca) foi utilizado o seguinte ciclo:

98 °C por 1 minuto	}	35 vezes
98 °C por 10 segundos		
72 °C por 1 minuto		
72 °C por 5 minutos		
4 °C até o fim da reação		

Os tamanhos esperados para *VEA* e *VOSA* foram 1,7 Kb e 2,0 Kb, respectivamente e os tamanhos dos amplicons foram confirmados por eletroforese.

Para os demais plasmídeos de iscas e presas de *VELB* e *VELC* o ciclo utilizado foi:

98 °C por 1 minuto	}	35 vezes
98 °C por 10 segundos		
54,6 por 10 segundos		
72 °C por 1 minuto		
72 °C por 5 minutos		
4 °C até o fim da reação		

O tamanho esperado para *VELB* e *VELC* foi de 1,9 Kb para ambos os fragmentos. Os tamanhos foram confirmados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

### 3.7.7 Transformação das leveduras de *S. cerevisiae*

Foram feitas células competentes das cepas Y2HGold e Y187 conforme o protocolo de Acetato de Lítio seguindo as instruções contidas no manual *Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 User Manual* (Clontech). Em seguida, as células competentes foram transformadas com seus respectivos plasmídeos, no qual 100 ng de DNA plasmidial e 10 µg de DNA carreador foram adicionados a um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL pré-resfriado. Após, foram adicionados 50 µL de

leveduras competentes e misturadas gentilmente ao DNA. Em seguida foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  da mistura de PEG e Acetato de lítio, e as mesmas foram incubadas a 30  $^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Após a incubação, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de DMSO e misturados gentilmente. A mistura foi colocada em banho-maria a 42  $^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos e centrifugadas a velocidade máxima por 15 segundos. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 mL de YPD *Plus*, o ressuspendido foi novamente centrifugado por 15 segundos em velocidade máxima e o pellet foi ressuspenso em 1 mL de salina estéril (NaCl 0,9%). Em seguida, a suspensão de células foi diluída na proporção de 1:10 e 1:100 e 100  $\mu\text{L}$  das mesmas foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio SD/-Tryptofano e SD/-Leucina para iscas e presas, respectivamente. Após 48 horas, foi observado o crescimento das colônias e as mesmas foram submetidas ao teste de toxicidade que consiste em comparar o tamanho das colônias transformadas com o vetor vazio e o vetor com o inserto de interesse; e ao teste de autoativação que consiste no plaqueamento das colônias em duas placas de seu respectivo meio (SD/-Leucina ou SD/-Tryptofano), a primeira placa suplementada com 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  X- $\alpha$ -Gal e a segunda suplementada com 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  X- $\alpha$ -Gal e 200  $\text{ng}/\text{mL}$  de Aureobasidina A. A autoativação foi verificada por meio da coloração azulada das colônias que se auto ativam e a toxicidade pelo tamanho das colônias das diluições em relação aos controles (leveduras transformadas com pGBKT7 ou pGADT7 vazios).

### 3.7.8 Acasalamento de *S. cerevisiae* para duplo-híbrido

Até o momento, a padronização do acasalamento entre as cepas isca e presa de *S. cerevisiae* estão sendo realizadas para reduzir os resultados falso-positivos e falso-negativos de interação de proteínas.

Para a realização dos experimentos de duplo-híbrido, as cepas-teste (iscas de pGBKT7 vazio, VEA, VELB, VELC, VOSA e presas de pGADT7 vazio, VEA, VELB e VELC) são crescidas em meio apropriado e os cruzamentos são plaqueados três meios diferentes, SD/QDO acrescido de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de X- $\alpha$ -Gal e 200  $\text{ng}/\text{mL}$  de Aureobasidina A, SD/QDO acrescido de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de X- $\alpha$ -Gal e SD/DDO sem suplementação alguma, porém até o momento o nosso grupo não conseguiu padronizar a melhor forma de crescer as cepas e verificar a interação.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise *in silico* do gene *VEA* e *VELC* de *C. neoformans* utilizando o banco genômico disponível

As sequências genômica e proteica de *VEA* (CNAG\_02387.2) e *VELC* (CNAG\_02697.2) de *C. neoformans*, disponíveis no banco de dados *Broad Institute* ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus\\_neoformans/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans/MultiHome.html)), foram identificadas por meio da comparação da sequência de *VeA* de *Aspergillus nidulans* (Número de acesso: AAD42946.1) e *VelC* (Número de acesso: XP\_659663.1) tendo o BLASTp como ferramenta de comparação (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências foram confirmadas com a anotação do banco genômico.

Em adição, também foram encontrados homólogos de *VeA* e *VelC* em outros fungos (**Tabela 2 e 3**), no qual foi realizado o alinhamento múltiplo das sequências de cada um dos genes por meio da ferramenta *CLUSTALW algorithm* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (**Figura 9 e 10**), cuja finalidade foi buscar domínios conservados entre as sequências proteicas dos fungos listados na **Tabela 2 e 3**. O alinhamento permitiu que fossem construídas árvores filogenéticas por meio do *software online ClustalW Phylogeny* ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/clustalw2\\_phylogeny/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/clustalw2_phylogeny/)) o qual permitiu estabelecer a relação filogenética destes organismos. Em adição, foi realizada a análise de identidade e similaridade das sequências de *VeA* (AFR95444.1) e *VelC* (AFR93993.1) de *C. neoformans* em relação as sequências dos outros fungos por meio de alinhamento global em pares *Needle-Emboss* ([https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)).

Em 2013 houve uma atualização no banco de dados do Broad Institute, no qual a CNAG\_02387.2 (Número de acesso: AFR95444.1), correspondente à *VEA*, fora atualizada para CNAG\_02387.7 (Número de acesso: AFR95444.2) e a mesma sofrera alterações no tamanho do gene e conseqüentemente transcrito e proteína. Tal atualização foi baseada no transcriptoma de *C. neoformans* var. *grubii* usando bibliotecas específicas e não específicas (Janbon *et al.*, 2014). A sequência de *VELC* não foi modificada pela atualização, porém foram identificados mais dois genes (CNAG\_04086.7 e CNAG\_05697.7) que possuem o domínio *vel/vet*.

Antes da atualização no banco de dados, o gene que codifica *VEA* possuía 1385 nucleotídeos, porém atualmente a sequência é constituída de 1968

nucleotídeos. Como consequência da atualização, o transcrito atualmente possui aproximadamente 1650 nucleotídeos, enquanto o transcrito antigo possuía 1113 nucleotídeos. A proteína atual possui 549 resíduos de aminoácidos contra 370 resíduos de aminoácidos existentes na sequência antiga (**Figura 10a** e **Figura 10b**), porém o domínio *vel/vet* não foi modificado devido a essa atualização. Em contrapartida, foi possível identificar a presença do domínio PEST na nova sequência de *VeA*.

A fim de demonstrar as diferenças entre as sequências de *VeA* (AFR95444.1 e AFR95444.2), ambas sequências foram alinhadas e os principais domínios foram destacados (**Figura 9**).

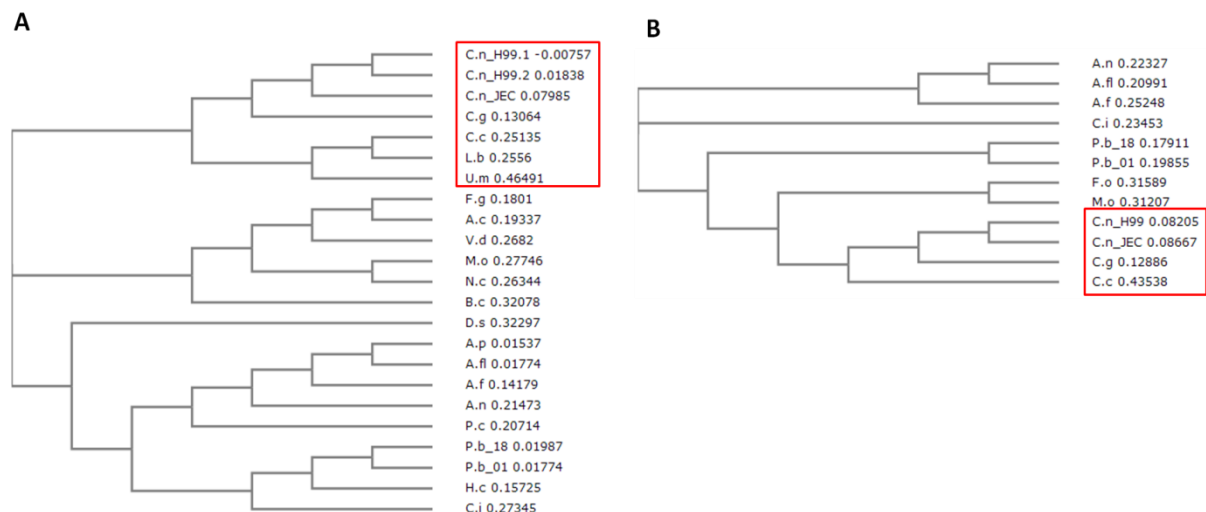
**Figura 9** - Alinhamento entre as sequências proteicas antiga e nova de *VEA*. H99\_1: sequência antiga de *VeA* (AFR95444.1); H99\_2: sequência atual de *VeA* (AFR95444.2). O domínio *vel/vet* está sublinhado e a região PEST está em destaque na cor verde.

H99_1	MS PANGGNVQAFAMPWAGNSSSYALVVRQQPERARLCSYKEENETIDRRPVDPPFVVELR	60
H99_2	MS PANGGNVQAFAMPWAGNSS- YALVVRQQPERARLCSYKEENETIDRRPVDPPFVVELR	59
	*****	
H99_1	<u>VGSGREVTPEQLLESTSFIRATTVASDPLTSASATSFTPSLFSSEPLTHTGPTYAPVKT</u>	120
H99_2	<u>VGSGREVTPEQLLESTSFIRATTVASDPLTSASATSFTPSLFSSEPLTHTGPTYAPVKT</u>	119
	*****	
H99_1	<u>PLGADATTGEVIQTPEKLRLLDGRMAVLCIFAKISVRVPGIFRLKFTLFETTEHGIVELA</u>	180
H99_2	<u>PLGADATTGEVIQTPEKLRLLDGRMAVLCIFAKISVRVPGIFRLKFTLFETTEHGIVELA</u>	179
	*****	
H99_1	<u>QTVSEPFVEVFS PKLFKGMHES TPLTRHLAAQGLKVKLRD TTVGRQSVRRRRASANPTIP</u>	240
H99_2	<u>QTVSEPFVEVFS PKLFKGMHES TPLTRHLAAQGLKVKLRD TTVGRQSVRRRRASANPTIP</u>	239
	*****	
H99_1	STPTFIKEDVFPAPMNI PPASS PHFLPTKSRLLP SLSAQAPSHSLSAQAPSHSLSAQAPSH	300
H99_2	STPTFIKEDVFPAPMNI PPASS PHFLPTKSRLLP SLSAQAPSHSLSAQAPSHSLSAQAPSH	299
	*****	
H99_1	QEVPS SSSKVARRTVSDS PRNLVWRHAA YEIVRPHATENRVSGPGERPFTDDGSPISPNP	360
H99_2	QEVPS SSSKVARRTVSDS PRNLVWRHAA YEIVRPHATENRVSGPGERPFTDDGSPISPNP	359
	*****	
H99_1	VDWRG---KLD FS-----	370
H99_2	VDWRVSAPS DLSAFSL SRLHRVDFRPPSPVNDTTS SAS PQSYTPSSYS STQLSSTQSL	419
	**** . *:*	
H99_1	-----	
H99_2	<b>PTTTPMTSSHSS</b> IQSTLPTPRRSLGIDDGVPILPLPSSFNSPGHAEFVPPSVNQVLNPL	479
H99_1	-----	
H99_2	RRSSTSSGPLEGHGSGAPS QSAAGPLTSRNRYSASIPGPSLRRPSP LTLPLRPPP	539
H99_1	-----	
H99_2	QEERSYERR	548

Fonte: Produção do próprio autor.

Por meio do alinhamento, também foi possível construir uma árvore filogenética e verificar que existe um ancestral comum na evolução de *VeA* e *VelC* de basidiomicetos e ascomicetos (**Figura 10**).

**Figura 10** - Cladograma esquemático do parentesco das proteínas *VeA* e *VelC* com os demais fungos. **(A)** Relação de parentesco de *VeA* com os demais fungos (% de identidade com *C. neoformans* (AFR95444.1); % de similaridade com *C. neoformans*). C.n\_JEC: *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) (32,7%; 34%); C.g: *C. gattii* (sorotipos B/C) (27,8%; 30,2%); C.n\_H99.1: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) correspondente à AFR95444.1 (antiga); C.n\_H99.2: *C. neoformans* var. *grubii* (A) correspondente à AFR95444.2 (atual) (66,5%; 66,5%); C.c: *Coprinopsis cinerea* (15,8%; 24,2%); A.p: *Aspergillus parasiticus* (20,2%;27,4%); A.fl: *A. flavus* (20%; 27,3%); A.f: *A. fumigatus* (19,2%; 26,3%); A.n: *A. nidulans* (18,8%; 29,1%); P.c: *Penicillium chrysogenum* (20,3%; 27,9%); P.b\_18: *Paracoccidioides brasiliensis* (17,9%; 27,8%); P.b\_01: *P. lutzii* (17,6%; 27,5%); H.c: *Histoplasma capsulatum* (19,5%; 27,5%); C.i: *Coccidioides immitis* (20,8%; 29,3%); F.g: *Fusarium graminearum* (20%; 28,9%); L.c: *Laccaria bicolor* (15,6%; 28,3%); M.o: *Magnaporthe oryzae* (18,6%; 26,3%); B.c: *Botrytis cinerea* (18,9%; 27,7%) A.c: *Acremonium chrysogenum* (22,5%; 31,8%); V.d: *Verticillium dahliae* (21,2%; 29,7%); N.c: *Neurospora crassa* (19,9%; 29,9%); D.s: *Dothistroma septosporum* (16%; 24,6%); Um: *Ustilago maydis* (12%; 21,3%). **(B)** Cladograma de parentesco de *VelC* com os demais fungos (% de identidade com *C. neoformans*; % de similaridade com *C. neoformans*). A.n: *A. nidulans*(12,1%; 20,1%); C.n\_JEC: *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) (79,8%; 84,4%); C.g: *C. gattii* (sorotipos B/C) (71,4%; 79,7%); C.n\_H99: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A); C.c: *Coprinopsis cinerea* (20,8%; 32,3%); A.fl: *A. flavus* (13,2%; 22,3%); A.f: *A. fumigatus* (14,8%; 21,1%); M.o: *Magnaporthe oryzae* (13,8%; 20,8%); P.b\_18: *Paracoccidioides brasiliensis* (15%; 24,1%); P.b\_01: *P. lutzii* (12,1%; 19,5%); C.i: *Coccidioides immitis* (14,5%; 21,5%); F.o: *Fusarium oxysporum* (13,5%; 20,4%). Os basidiomicetos estão em destaque nos quadros vermelhos.



Fonte: Produção do próprio autor.

O gene *VELC* de *Cryptococcus neoformans* possui 1799 nucleotídeos e é composto de 6 éxons e 5 introns. A proteína codificada por este gene é constituída de 494 resíduos de aminoácidos. Além da identificação por meio do banco de dados disponível e comparação das sequências de proteínas homólogas, foi feita a análise estrutural de *VeA* *VelC*, a fim de identificar os principais domínios encontrados nestas proteínas.

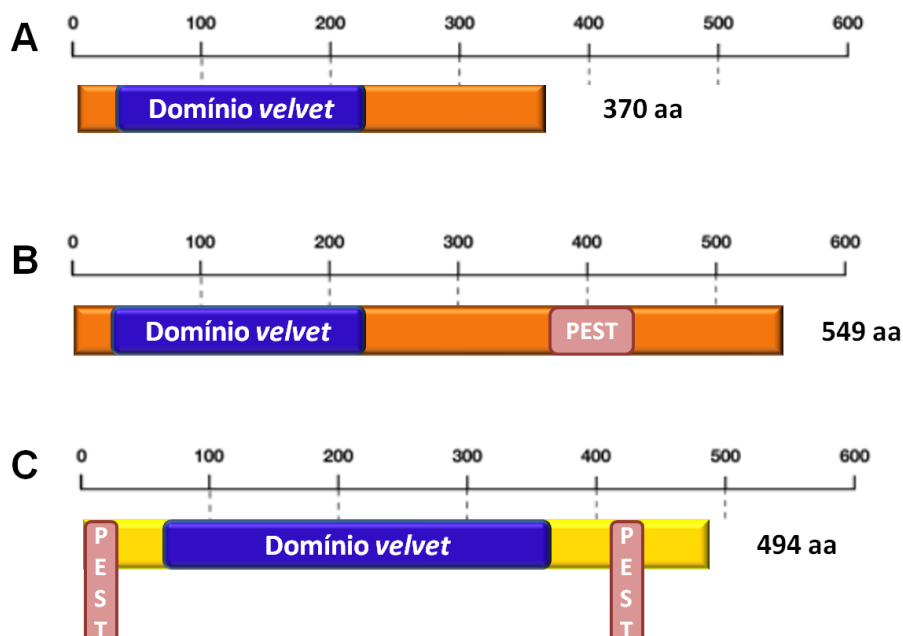


Com a ferramenta *online* Pfam, foi possível identificar a presença do domínio *velvet* nas sequências testadas na região N-terminal de ambas as proteínas. Em VEA o domínio *velvet* se encontra entre o 20º aminoácido e o 223º aminoácido, tanto na sequência atual, quanto na sequência antiga. Em *VELC*, o domínio *velvet* está localizado entre os aminoácidos 84 a 380.

Também foram buscados os sinais de exportação nuclear (NES), sinal de localização nuclear (NLS) com as ferramentas disponíveis, porém não foram encontrados esses domínios na sequência *VeA* e *Ve/C*. O domínio NES indica que a proteína é exportada do núcleo para o citoplasma, já o domínio NLS indica o processo inverso (Bayram & Braus, 2012).

Após a atualização do banco de dados, foi encontrado o motivo PEST na região C-Terminal de *VeA*, entre os aminoácidos 387 a 431. Em contrapartida, *Ve/C* apresenta dois motivos PEST. O primeiro domínio localiza-se entre o primeiro e o décimo quarto aminoácido. O segundo domínio PEST encontra-se na porção C-terminal da proteína, entre os aminoácidos 420 e 432. O domínio PEST é encontrado em proteínas instáveis que podem ter degradação rápida (Bayram & Braus, 2012). Com esses resultados em mãos, foi possível esquematizar a estrutura de *VeA* e *Ve/C* de *C. neoformans* (**Figura 11**).

**Figura 11** – Predição estrutural das proteínas *VeA* e *Ve/C* de *C. neoformans*. **(A)** Estrutura de *VeA* a partir da sequência AFR95444.1. **(B)** Estrutura de *VeA* a partir da sequência atualizada AFR95444.2. **(C)** Estrutura de *Ve/C*. Somente foram encontrados os domínios *velvet* e as regiões PEST.



Fonte: Produção do próprio autor.

A análise estrutural de *VeA* e *VelC* demonstram pequenas peculiaridades nestas proteínas quando comparadas à *VeA* e *VelC* de *A. nidulans* e *A. fumigatus*. A saber, os domínios NLS e NES estão presentes em *VeA* de *A. nidulans*, em contrapartida *VeA* de *A. fumigatus* não possui NES. Tais domínios não foram identificados em *VeA* de *C. neoformans* e ao contrário de *VeA* de *A. fumigatus*, o domínio PEST de *VeA* de *Cryptococcus neoformans* se encontra na região C-Terminal. Entretanto, *VelC* de *A. nidulans* não possui PEST, porém este domínio é encontrado em *A. fumigatus* na região N-Terminal. Surpreendentemente, foram identificados dois motivos PEST, um na região N e C-Terminal (Bayram & Braus, 2012; Park *et al.*, 2012).

A fim de verificar regiões conservadas nas proteínas *velvet* *VeA*, *VelB*, *VelC* e *VosA* de *C. neoformans*, também foi realizado o alinhamento múltiplo destas proteínas, incluindo as novas proteínas *velvet* encontradas no banco de dados, a fim de identificar regiões conservadas (**Figura 12**).

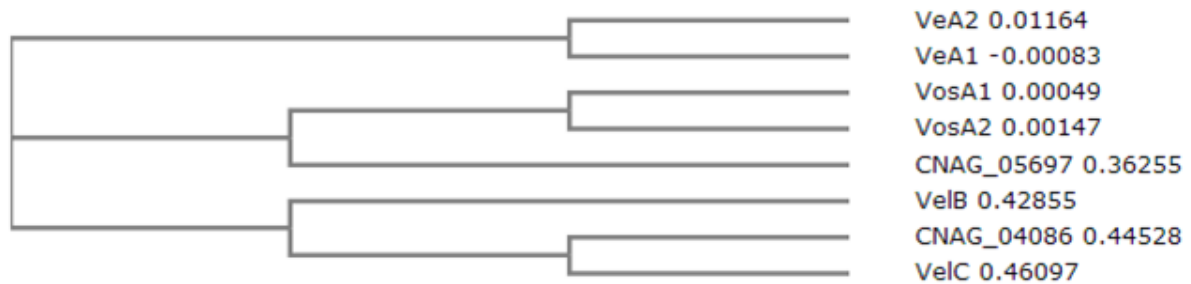
**Figura 12 -** Alinhamento múltiplo das sequências das proteínas *velvet* de *C. neoformans*. Foram incluídas as sequencias antiga (*VeA1*) e nova (*VeA2*) de *VeA*; antiga (*VosA1*) e nova (*VosA2*) de *VosA*; *VelB*, *VelC* e as novas proteínas *velvet* identificadas após a atualização do banco de dados.

VeA2	-----	
VeA1	-----	
VosA1	-----	
VosA2	MSARAHPPSSSSQQPHLSNILAPTSQPANTERTESEIQADDGDAEGEPGQKAGRRGSDK GK	60
CNAG_05697	-----	
Ve1B	-----MFPSTGKDLMLLETACPTSPLPTKKRK	27
CNAG_04086	-----	
Ve1C	-----	
VeA2	-----MS PANGGNVQAFAMPWAGNSSS YALVVRQQPERARLCS YKEENETIDRR	49
VeA1	-----MS PANGGNVQAFAMPWAGNSSS YALVVRQQPERARLCS YKEENETIDRR	49
VosA1	-----MRQQEVQARMCGIGDKS---	20
VosA2	EKDKEDDKIMIQGGVDYAYEYV PVTQRRQGRKNIT YELTMRQQEVQARMCGIGDKS---	117
CNAG_05697	-----MVNPSHVSSQLLRTYRITPIQQPLRSAAFKAYLSRL	38
Ve1B	RMDQTS SHLLPTNHEL FVDMNMA S KTGREGWTYHLE ILQEP L RARACGFGNKD---	83
CNAG_04086	-----MKSQPKSHL PRLHPQADRVPT YD P PDVLGRPHSHPHRGFMPYTC	44
Ve1C	-----MFVPQSSQDTESQHISSAVSIPRPIATAVEKHGSGQFAR	40
VeA2	PVDPPPVELRVGSGREVTPPEQ--LLESTSEFFIRATTVASDPLTSAATSETPSFLSSEPL	108
VeA1	PVDPPPVELRVGSGREVTPPEQ--LLESTSEFFIRATTVASDPLTSAATSETPSFLSSEPL	108
VosA1	PVDPTPIIQLKVIDPQGGDITS--IDPQTKQOIRRPSGSEGMTYMQNPPYFLFACLVGG--	77
VosA2	PVDPTPIIQLKVIDPQGGDITS--IDPQTKQOIRRPSGSEGMTYMQNPPYFLFACLVGG--	174
CNAG_05697	PLSPPLIIQLDCCWDARGEQIIP--YDELPE-----FLVCHLSLETP	76
Ve1B	PLTTPPIIIRLWIQDALGNQVDPNIVDSNAIILQVDLCSADGLEGRNVVRHVPGNVPAV	143
CNAG_04086	SQQPARPYAYAWEDYDYPYYPHSQSLDRQLSLPLQLPPLPYPAASYPATCAANPTNDI	104
Ve1C	EPDASFATSACASQPSNGNMRSS--DNALMLETPIILQKGFISGKKMRFALSAVEQPEVL	97
VeA2	THTGPTYAP--VKTEPLGADATTGEVIQTPEKLRLLDGRMAVLCIFAKISVRVPG--IFRLK	165
VeA1	THTGPTYAP--VKTEPLGADATTGEVIQTPEKLRLLDGRMAVLCIFAKISVRVPG--IFRLK	165
VosA1	--EEQDEDLH--VIDDGKTRFLTGTTPVSSLYHLKDLDNSDAEPFVFPDLGVRKES--RYKLK	133
VosA2	--EEQDEDLH--VIDDGKTRFLTGTTPVSSLYHLKDLDNSDAEPFVFPDLGVRKES--RYKLK	230
CNAG_05697	NGQDAAIVT--SPDTEFVSMLYGTLIATPAEMDDQTSAGQGVYFVFPDVSVRHVG--RFRKL	133
Ve1B	VSLDENVRSGHLDPSALPSTPAAVSBQPYSDPMSDHYSSWSKHYSVSDS DRTPGWTYQDT	203
CNAG_04086	NSANVNKHGSTRQPTPEPPPPASAPPEPSAAGRTSELSGFQVDYTRVSPKAVR--RFRM	163
Ve1C	GRRKTEKDRRPLGPAPIVRLRAVECRSVEDDTGVIIEEVDAGTLDVANNVCAADLCAPTT	157
VeA2	F'TLFETTEHGIVELAQTIVSEPEFEVFSFKLFKGMHESTPLTRHLAAQGLVKVLR-----T	219
VeA1	F'TLFETTEHGIVELAQTIVSEPEFEVFSFKLFKGMHESTPLTRHLAAQGLVKVLR-----T	219
VosA1	LTLFEIVDQEVYCYCTMPTSTFSVYSAKKFPGMS TA-----A	170
VosA2	LTLFEIVDQEVYCYCTMPTSTFSVYSAKKFPGMSKATDLSVSAEQGLKIRVRKDDPPQPA	290
CNAG_05697	ALLMRITSGPAVHVS--VTRTEFIVHKKDY--	161
Ve1B	FASPRIASTHPSIARKVRTPTSPSTAPSLRPPAAMSDVVS-----	243
CNAG_04086	LEEEEEVEVGGIIVHKTIVLLKGDADSGIDHDQVGEIGP-----	201
Ve1C	TQHSIAIETNEAKLLPESEHRPYGEHDTSLVNFAGVTS-----S	196
VeA2	D'TTVGRQSVRRRRASANPTIESTPTFIKEDVPAPMNI-----PPASSPHELEPTKS	269
VeA1	D'TTVGRQSVRRRRASANPTIESTPTFIKEDVPAPMNI-----PPASSPHELEPTKS	269
VosA1	RATASSSGKSKRKS DAHESSEETPAQGGQSKRTRGLSMGYPGHEQRFHPPESEHHYYPYP	230
VosA2	RATASSSGKSKRKS DAHESSEETPAQGGQSKRTRGLSMGYPGHEQRFHPPESEHHYYPYP	350
CNAG_05697	QRPLYDEALPPISALAEDIRDPSGRSFPDPHNSMQR-----PTSSSLLRSRP	291
Ve1B	--PPPEAYIVLRPHRVFIVNLDGKVSQVGVGGGGMGT-----TKGKGYGKS	246
CNAG_04086	EQASSGFPSTPARKARDQAVTSEVDPTSLGDAPLAADVVR-----	235
VeA2	RLLPFLSAQAP--SHLSAQAPSHLSAQAPSHQEVPSSSSKVARRTVSDSPRNLVWRHA	327
VeA1	RLLPFLSAQAP--SHLSAQAPSHLSAQAPSHQEVPSSSSKVARRTVSDSPRNLVWRHA	327
VosA1	NYPPFPSSGYYPFSGHPMPPEPPPSAYDFYRSHMSRSGSPHPYHPSYPPYSAEGYPPPESS	290
VosA2	NYPPFPSSGYYPFSGHPMPPEPPPSAYDFYRSHMSRSGSPHPYHPSYPPYSAEGYPPPESS	410
CNAG_05697	-----IAPPV TALTKHFDSQRIVREGLPRYQ-----	187
Ve1B	HTSYS TDLS TAPTDYSFGRPTTSS TASWHLSADSEYKGFALSAEERSKPGHRP--KSN	350
CNAG_04086	IGTVSRKGVVDVGGDDGVPDIPTEFQWSEYELVLSQSPTRGRALGNLPSRGEPSLSAP	306
Ve1C	--EKAARKWKRKSSSGEVSSGSATEIERARRSGAGHGAAPERNLVGNLVHVGKVPDLE	294
VeA2	AYEIVRPHATENRVSGEG--ERFFTDGGSFISPNFVDWRVSPASSDLSAFSLSRHRV--	383
VeA1	AYEIVRPHATENRVSGEG--ERFFTDGGSFISPNFVDWRVSGEG--KLFDS--	370
VosA1	YHVNSSGRPS THBESGSRHRHSLPPEGYVLSRLIPSPS--SLGHAYPIPPGMGY--	345
VosA2	YHVNSSGRPS THBESGSRHRHSLPPEGYVLSRLIPSPS--SLGHAYPIPPGMGY--	465
CNAG_05697	DSKVPMLSAETQTTSPGSFLPASFSDFRFLHDSQQLPHSYHNCHYRNSVASVKDMDLSL--	408
Ve1B	LIVQLIVRDGSGGIIIPADNSALSRRLVMMVDLVSADGKQSRGVVVRVCAAGSGGVEGK	366
CNAG_04086	GKMGVWFLE'TDLCVRQEGSYSLRRFRCYDITAVEBGGLEVAQLAECRSQPFRIYSPRQIP--	353
VeA2	---DFRPPSVPNDDTSSAS PQSYTPSSYSSTQLSSTQSLPTTPPEMTSSHS IQSTLPT	440
VeA1	---DFRPPSVPNDDTSSAS PQSYTPSSYSSTQLSSTQSLPTTPPEMTSSHS IQSTLPT	440
VosA1	---PPYFMHSES YDRAGMPWPQDHRPILPLPFPHPESVMGRPGSRGTGHRSTHPS SLRQGG	402
VosA2	---PPYFMHSES YDRAGMPWPQDHRPILPLPFPHPESVMGRPGSRGTGHRSTHPS SLRQGG	522
CNAG_05697	---HIPDLLTMTKETRYVABASAASTLVLVGRHHTPCNKLKDEHGRIGLGFATDLGVRTE	465
Ve1B	VGGEDGVESSYHLRNLGGETFRLSSTTSQSRGKEKKRGEGRGKKEKNEIFSEMAYRTP	426
CNAG_04086	-----ILPKLTELAEHFAKLGFKLNTRKNDRAAQSPLPPPSTAPPSSAHAAVLTM	403
VeA2	PRRSLGIDDGVPILPLPS SFNS PGHAEFVPPSVNQLNPLRRSSTSSGGLPEGHSGGAP	500
VeA1	PRRSLGIDDGVPILPLPS SFNS PGHAEFVPPSVNQLNPLRRSSTSSGGLPEGHSGGAP	500
VosA1	SPLAS PGRFQYAQS PDMGYSRPS SAGTGDGRDGRERERERELHRRS PVLPLPLTRSPAL	462
VosA2	SPLAS PGRFQYAQS PDMGYSRPS SAGTGDGRDGRERERERERELHRRS PVLPLPLTRSPAL	582
CNAG_05697	GRFCLRMKIMDLSLFSR--APNPGDSTVLAETTSQPIEVYSAKRFPGVIPPTKLTRLF	522
Ve1B	GBYALMVRLLDIAGPPHLG---TSIGVTRSLAEVLTKPFTVPHSSKFPGSIPVTELSVEF	483
CNAG_04086	GSRRPQPCPIQLDPS SHMSPSSSTSNSEKAMRSTSTGQCTSFMTDNTSRTSNLSLGGSGES	463
Ve1C	-----	
VeA2	SQSAAGPLTSRNRXLSASIPGPS SLRFPPLTLPPLRFPPEERSYERR	549
VeA1	SQSAAGPLTSRNRXLSASIPGPS SLRFPPLTLPPLRFPPEERSYERR	549
VosA1	IPQSLPEITDPRDSRESQNESRASVGEGSGSRPSSSGKNKMGGLNLLG--	510
VosA2	IPQSLPEITDPRDSRESQNESRASVGEGSGSRPSSSGKNKMGGLNLLG--	630
CNAG_05697	-----	
Ve1B	AAQGIKLAVRESHKQKHRNKESVDMVDVQDEIEEDEGGQ-----	560
CNAG_04086	ARQGERNLGQRKVRDAIAGSSEEDDG-----	509
Ve1C	SAKGASTAQTGQSFQVTSVSEENNGTGTG-----	494

Fonte: Produção do próprio autor.

Ainda utilizando o alinhamento múltiplo, foi possível realizar a análise filogenética entre as proteínas *velvet* de *C. neoformans* (**Figura 13**).

**Figura 13** – Cladograma comparativo das proteínas *velvet* de *C. neoformans* incluindo as novas sequências encontradas após a atualização do banco de dados. *VeA1* e *VosA1* correspondem as sequências proteicas disponíveis no banco de dados antes da atualização do mesmo, *VeA2* e *VosA2* são as sequências proteicas atuais.



Fonte: produção do próprio autor.

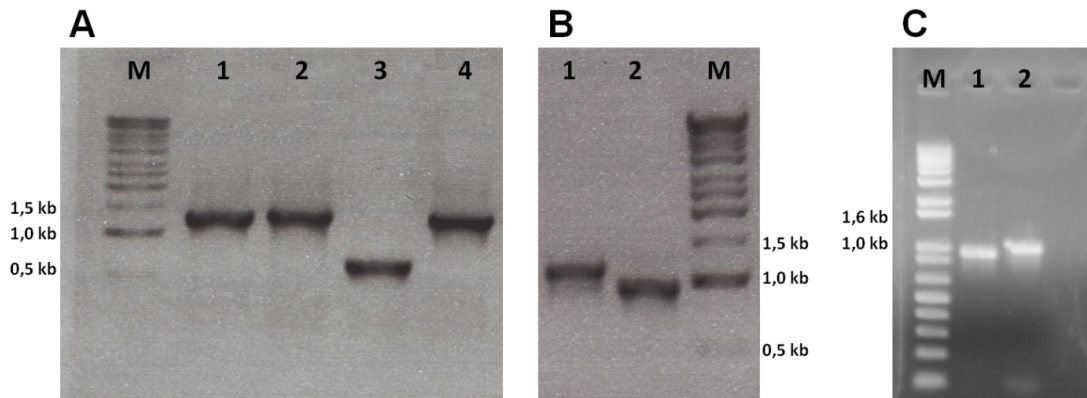
Através do alinhamento múltiplo, foi possível observar pouquíssima conservação dos aminoácidos entre as proteínas *velvets* de *C. neoformans*. Também foi possível observar que as novas proteínas codificadas pelos CNAG\_05697 e CNAG\_04086 se assemelham as proteínas *velvet VosA* e *VelC* de *C. neoformans*, respectivamente.

#### 4.2 Avaliação da função gênica de *VEA* e *VELC* através de deleção gênica no modelo *C. neoformans*

Os genes *VEA* e *VELC* de *C. neoformans* foram deletados por meio da integração homóloga do cassete de deleção *VEA::HPH* no *locus* das leveduras haploides KN99 $\alpha$ , que confere resistência à Higromicina B, e *VEA::NAT* no *locus* das leveduras haploides KN99 $\alpha$ , que confere resistência à Nourseotricina. Para *VELC*, foram utilizados os cassetes de deleção *VELC::HPH*, no *locus* das leveduras haploides KN99 $\alpha$  e *VELC::NAT* no *locus* das leveduras haploides KN99 $\alpha$ , a *ORF* (*VELC*) ou parte dela (*VEA*) dos genes alvos foram substituídos pelo cassete.

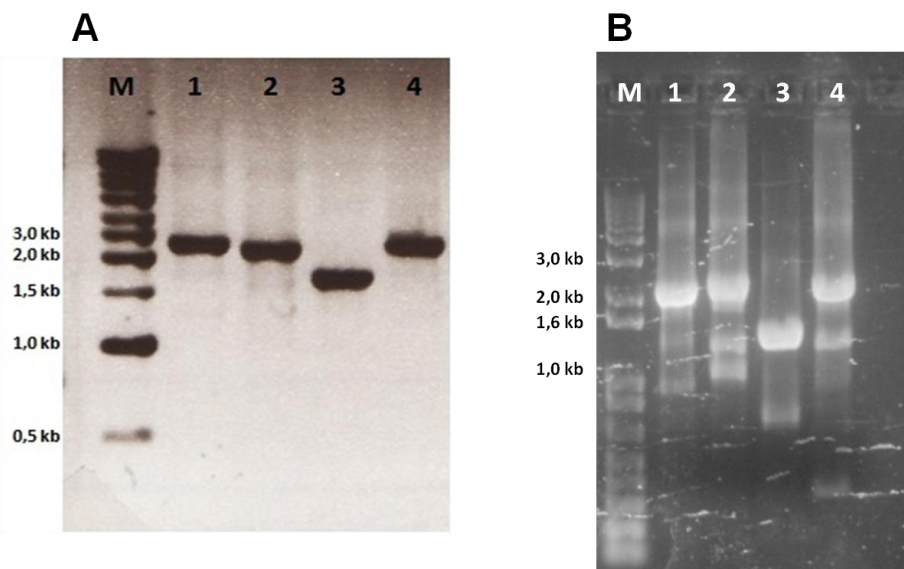
O cassete foi obtido *in vitro* por PCR *Double Joint*, que consistiu em duas etapas de PCR, já descritas anteriormente na metodologia. Os tamanhos obtidos dos produtos da reação foram confirmados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8 % (**Figuras 14 e 15**) e, assim, os fragmentos foram co-transformados em células leveduriformes haploides KN99 $\alpha$  e KN99 $\alpha$  (sorotipo A) de *C. neoformans* via biobalística.

**Figura 14** - Confirmação dos produtos de PCR obtidos na primeira etapa da técnica de PCR *Double Joint* que consiste na obtenção dos fragmentos das marcas de seleção e dos fragmentos adjacentes ao gene alvo. **(A)** M. Marcador Molecular; 1. Fragmento 3 + 4 hph (1235 pb); 2. Fragmento 5 + 6 hph (1295 pb); 3. Fragmento 3 + 4 nat (639 pb); 4. Fragmento 5 + 6 nat (1176 pb). **(B)** 1. Fragmento 1 + 2 VEA região adjacente 5' de VEA (1051 pb); 2. Fragmento 7 + 8 VEA que corresponde a região adjacente 3' de VEA (890 pb). **(C)** M. Marcador molecular 1. Fragmento 1 + 2 VELC que corresponde a região adjacente 5' de VELC (873 pb); 2. Fragmento 7 + 8 VELC que corresponde a região adjacente 3' de VELC (936 pb).



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

**Figura 15** - Confirmação dos produtos obtidos na segunda etapa da técnica de PCR *Double Joint* que consiste na fusão dos fragmentos adjacentes ao gene alvo com os fragmentos das marcas de seleção. **(A)** M. Marcador molecular; 1. Fragmento 1 + 4 hph VEA (2,2 kb); 2. Fragmento 5 + 8 hph VEA (2,1 kb); 3. Fragmento 1 + 4 nat VEA (1,6 kb); 5 + 8 nat VEA (2,2 kb). **(B)** M. Marcador molecular; 1. Fragmento 1 + 4 hph VELC (2,1kb); 2. Fragmento 5 + 8 hph VELC (2,2 kb); 3. Fragmento 1 + 4 nat VELC (1,5 kb); 5 + 8 nat VELC (2,2 kb).

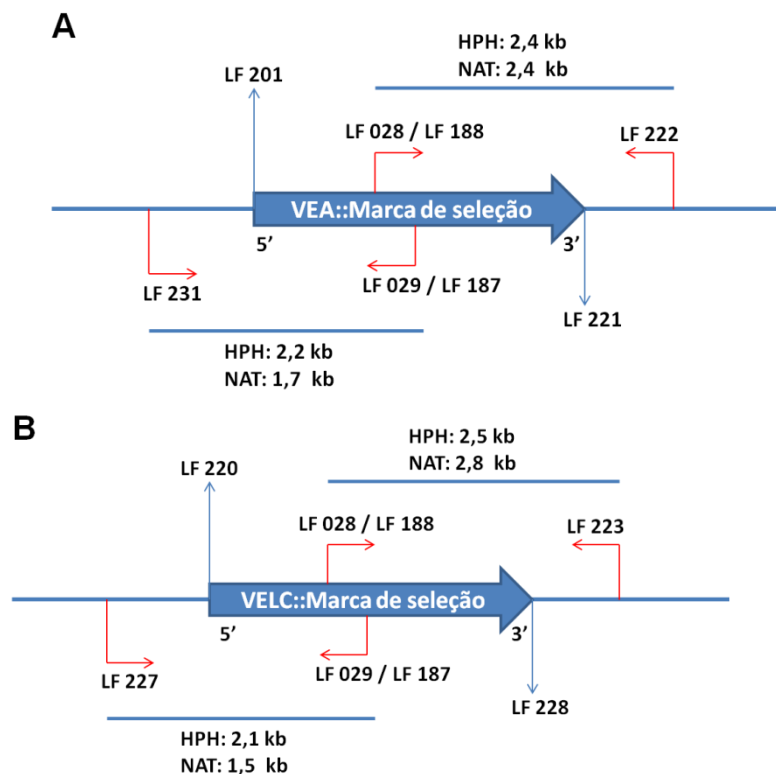


Fonte: Produção do próprio autor.

Após a transformação, os transformantes que cresceram em meio YPD acrescido com a droga de sua respectiva marca de seleção, foram escolhidos aleatoriamente e seu DNA foi extraído conforme o protocolo descrito. Foram

selecionados, independentemente, o mesmo número de mutantes *MATa* e *MAT $\alpha$*  para a confirmação da deleção das ORF's de *VEA* e *VELC* na qual foram realizadas duas reações de PCR comum por gene conforme esquema (**Figura 16a e 16b**).

**Figura 16** - Esquema para a confirmação de deleção de *VEA* e *VELC* em *C. neoformans*. **(A)** Esquema representativo das reações de confirmação da deleção gênica de *VEA* para as linhagens *MATa* e *MAT $\alpha$* . **(B)** Esquema representativo das reações de confirmação da deleção gênica de *VELC* para as linhagens *MATa* e *MAT $\alpha$* .



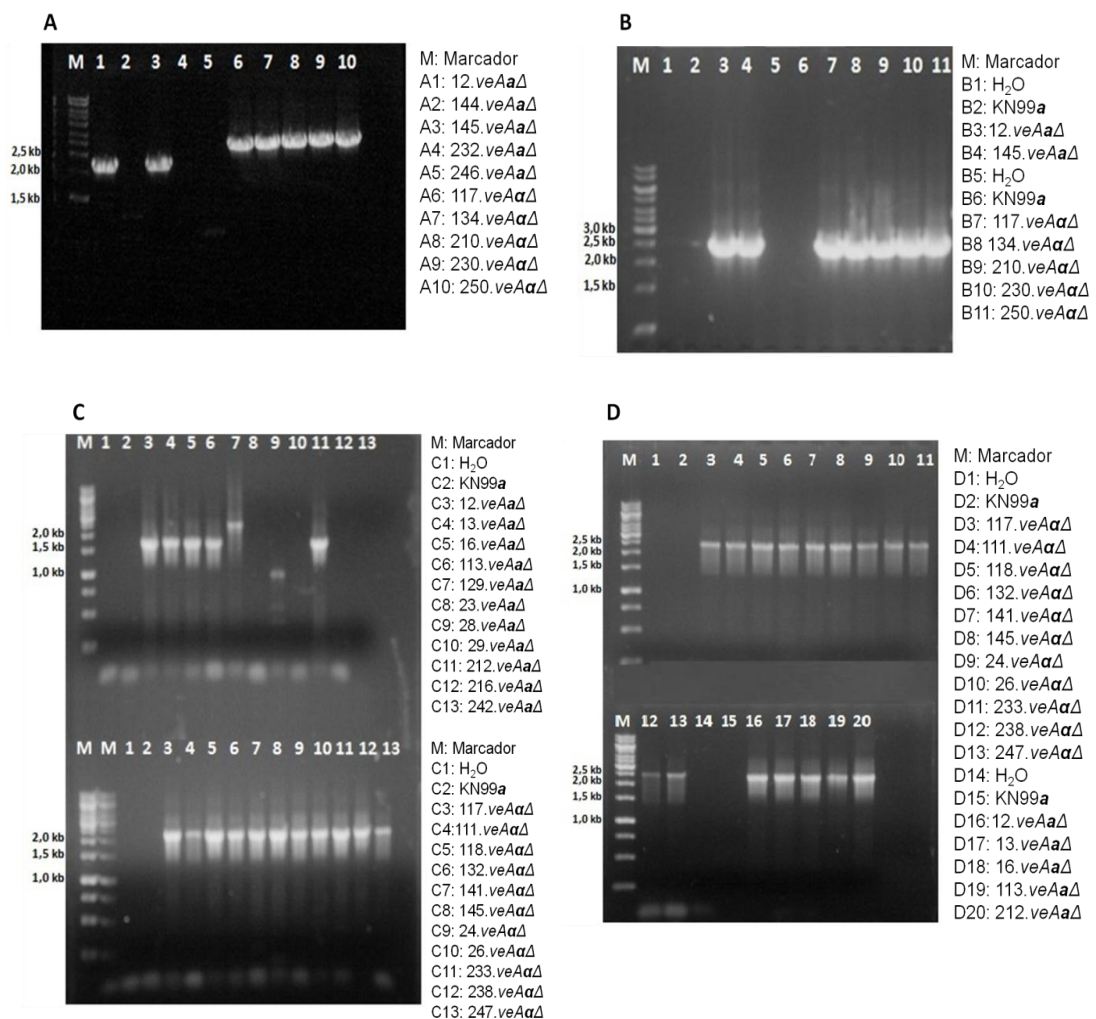
Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Para *VEA*, foram feitas duas reações para confirmar a deleção. A primeira reação (**Figura 17a e 17c**) consistiu na amplificação da região 5' de *VEA* dos possíveis mutantes de ambas as marcas de seleção. Para tal, foram utilizados os oligonucleotídeos LF231 + LF029 para amplificar a região 5' dos transformantes cuja marca de seleção foi *HPH*. E foram usados os oligonucleotídeos LF231 + LF187 para amplificar a região 5' dos transformantes cuja marca de seleção foi *NAT*. Os tamanhos esperados para a região 5' dos mutantes foram de 2,2 Kb e 1,7 Kb para os mutantes resistentes à Higromicina B e à Nourseotricina, respectivamente.

Para a reação 3' dos mutantes cuja marca foi *HPH*, foram utilizados os oligonucleotídeos LF028 + LF222. Para a reação 3' dos mutantes resistentes à

Nourseotricina foram usados os oligonucleotídeos LF188 + LF222. Os tamanhos esperados para a região 3' dos mutantes foram de 2,4 Kb para ambas as marcas de seleção (**Figura 17b e 17d**). Água ultrapura e o DNA do selvagem foram utilizados como controle negativo.

**Figura 17** - PCR de confirmação 5' e 3' dos possíveis mutantes de *VEA* nos *MAT $\alpha$*  e *MAT $\alpha$*  de *C. neoformans*. **(A)** Confirmação 5' de ambos os tipos sexuais. O tamanho esperado foi de 2,2 Kb para os mutantes cuja marca era *HPH* e 1,7 Kb para os mutantes cuja marca era *NAT*. **(B)** Confirmação 3' de ambos os tipos sexuais. O tamanho esperado foi de 2,4 Kb para os mutantes de ambas as marcas de seleção. **(C)** Confirmação 5' de ambos os tipos sexuais. **(D)** Confirmação 3' de ambos os tipos sexuais.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

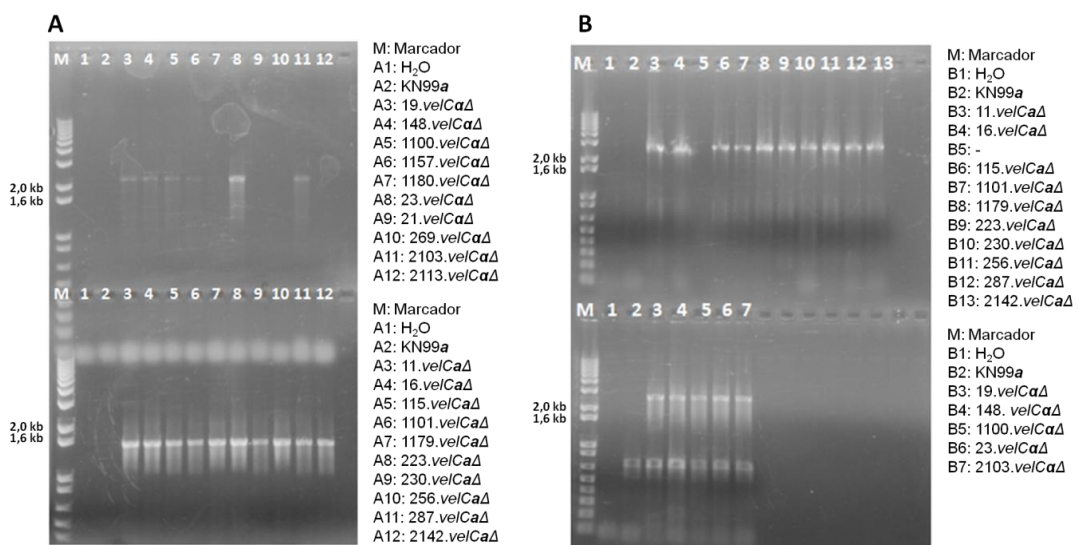
Para *VELC*, foram feitas duas reações para confirmar a deleção. A primeira reação (**Figura 18a**) consistiu na amplificação da região 5' de *VELC* dos possíveis mutantes de ambas as marcas de seleção. Para tal, foram utilizados os oligonucleotídeos LF227 e LF029 para amplificar a região 5' dos transformantes cuja



marca de seleção foi *HPH*, e foram usados os oligonucleotídeos LF227 e LF187 para amplificar a região 5' dos transformantes cuja marca de seleção foi *NAT*. Os tamanhos esperados para a região 5' dos mutantes foram de 2,1 Kb e 1,5 Kb para os mutantes resistentes à Higromicina B e à Nourseotricina, respectivamente.

Para a reação 3' dos mutantes cuja marca foi *HPH*, foram utilizados os oligonucleotídeos LF028 e LF223. Para a reação 3' dos mutantes resistentes à Nourseotricina foram usados os oligonucleotídeos LF188 e LF223. Os tamanhos esperados para a região 3' dos mutantes foram 2,5 Kb e 2,8 Kb para os mutantes resistentes à Higromicina B e à Nourseotricina, respectivamente (**Figura 18b**). Água ultrapura e o DNA do selvagem foram utilizados como controle negativo.

**Figura 18** - PCR de confirmação 5' e 3' dos possíveis mutantes de *VELC* nos *MAT $\alpha$*  e *MAT $\alpha$*  de *C. neoformans*. **(A)** Confirmação 5' de ambos os tipos sexuais. O tamanho esperado foi 2,1 Kb para a marca *HPH* e 1,5 Kb para a marca *NAT*. **(B)** Confirmação 3' de ambos os tipos sexuais. O tamanho esperado foi de 2,8 Kb para a marca *NAT* e 2,5 Kb para a marca *HPH*.

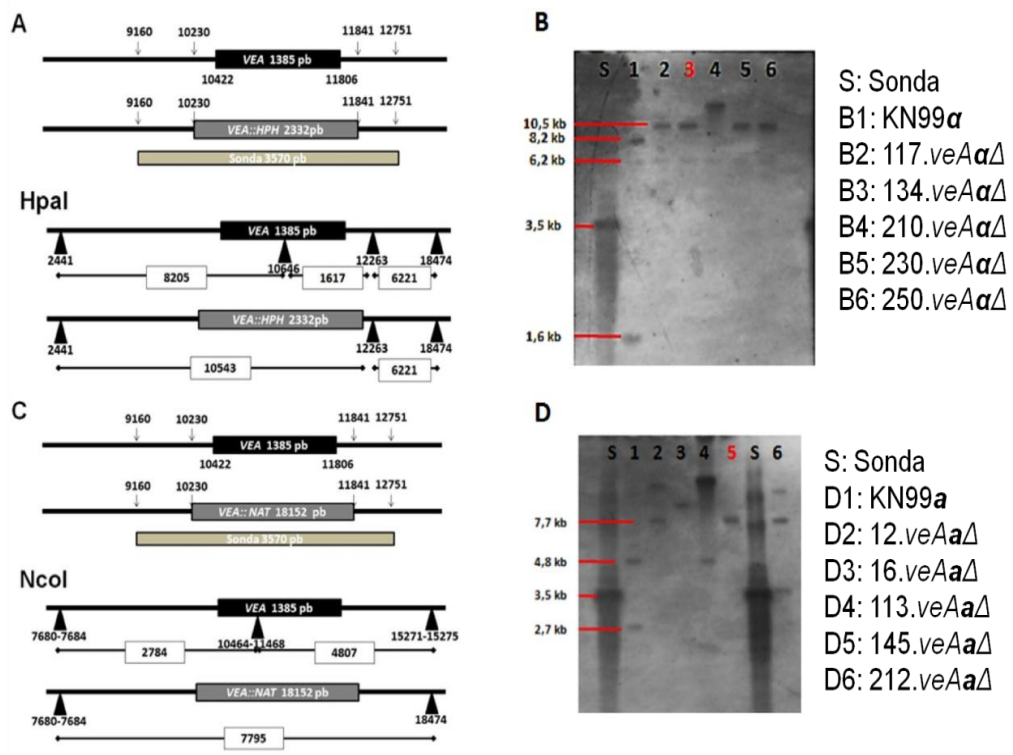


Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Após a PCR confirmatória, cinco mutantes de cada tipo sexual, foram submetidos ao *Southern Blot*, sendo que os mutantes que tiveram seus genótipos confirmados segundo o perfis de restrição obtidos com as enzimas *HpaI*, para *veAaΔ* (**Figura 19a** e **19b**); *NcoI*, para *veAaΔ* (**Figura 19c** e **19d**); *NcoI* para *velCaΔ* (**Figura 21a** e **21b**) e *SphI* para *velCaΔ* (**Figura 21c** e **21d**) foram utilizados para os testes fenotípicos.



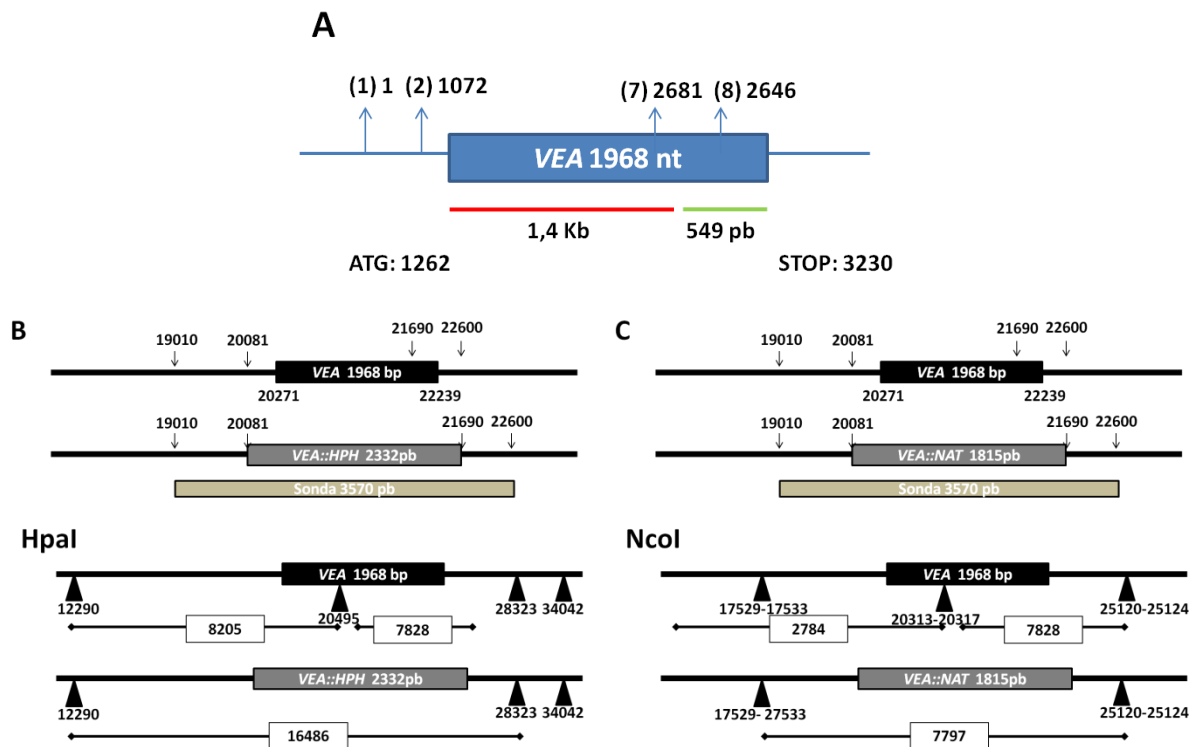
**Figura 19** - Confirmação por *Southern Blot* da deleção de *VEA* nos mutantes confirmados por PCR. 10 µg de DNA total digerido com a enzima *HpaI* para os mutantes resistentes à Higromicina B e *NcoI* para os mutantes resistentes à Nourseotricina. Em seguida, o DNA digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1 %, transferidos para membrana de nylon positivamente carregada e hibridizados com a sonda de *VEA* (3,5 Kb amplificação com oligonucleotídeos LF201 + LF221) marcada quimicamente com fosfatase alcalina (*Gene Images Alkphos direct labelling and detection system, Amersham Biosciences*). **(A)** Perfil de restrição para *HpaI* do locus de *VEA*. **(B)** Resultado do *Southern blot* após hibridização com sonda de *VEA* para os mutantes que contem a marca *HPH*. **(C)** Perfil de restrição para *NcoI* do locus de *VEA*. **(D)** Resultado do *Southern blot* após hibridização com sonda de *VEA* para os mutantes que contem a marca *NAT*. Os mutantes escolhidos estão destacados em vermelho.



Fonte: Produção do próprio autor.

É importante enfatizar que devido à atualização do banco de dados, *VEA* não foi completamente deletado como demonstra a **Figura 20**.

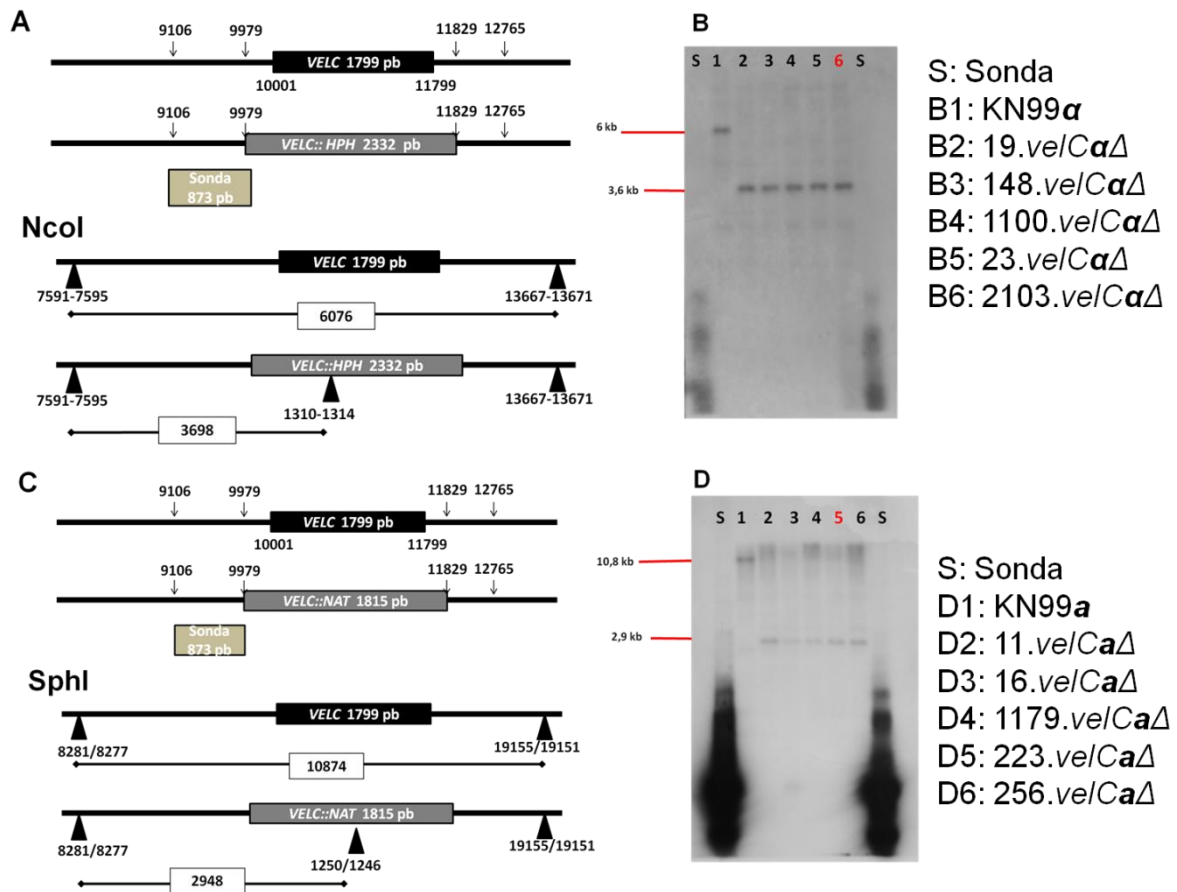
**Figura 20** - Esquema da deleção parcial de *VEA* e estudo de restrição da sequência atualizada de *VEA* de *C. neoformans*. **(A)** As setas indicam os oligonucleotídeos do cassete. A região deletada neste estudo está representada pela linha vermelha, que corresponde a 1,4 Kb. Restaram 549 pares de bases para a completa deleção do gene. **(B)** Estudo de restrição com *HpaI*. **(C)** Estudo de restrição com *NcoI*.



Fonte: Produção do próprio autor.

Por meio do estudo de restrição realizado com a nova sequência genômica de *VEA*, foi possível observar que não houve diferença no perfil esperado para os mutantes de *VEA* transformados com o cassete de deleção *VEA::NAT* (**Figura 20c**), porém observa-se uma diferença no perfil esperado quando os mutantes foram transformados com o cassete de deleção *VEA::HPH* (**Figura 20b**).

**Figura 21** - Confirmação por *Southern Blot* da deleção de *VELC* nos mutantes confirmados por PCR. 10 µg de DNA total digerido com a enzima *Nco*I para os mutantes resistentes à Higromicina B e *Sph*I para os mutantes resistentes à Nourseotricina. Em seguida, o DNA digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1 %, transferidos para membrana de nylon positivamente carregada e hibridizados com a sonda de *VELC* (873 pb amplificação com oligonucleotídeos LF 220 + LF229). **(A)** Perfil de restrição para *Nco*I do locus de *VELC*. **(B)** Resultado do *Southern blot* após hibridização com sonda de *VELC* para os mutantes que contem a marca *HPH*. **(C)** Perfil de restrição para *Sph*I do locus de *VELC*. **(D)** Resultado do *Southern blot* após hibridização com sonda de *VELC* para os mutantes que contem a marca *NAT*. Os mutantes escolhidos estão destacados em vermelho.

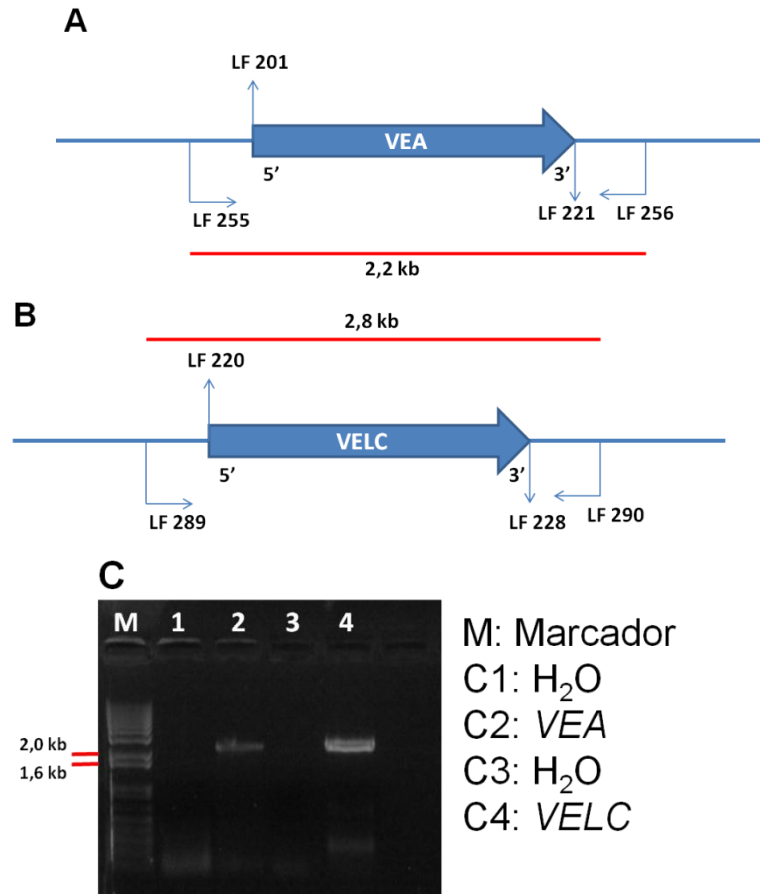


Fonte: Produção do próprio autor.

#### 4.3 Obtenção dos reconstituídos *veA*Δ::*VEA* e *velC*Δ::*VELC*

Para a obtenção de reconstituídos de *VEA* ou *VELC*, foram desenhados oligonucleotídeos de reconstituição que se localizassem 0,5 Kb para fora da ORF de dos seus respectivos genes (**Figura 22**).

**Figura 22** - Esquema da estratégia para obtenção dos fragmentos de reconstituição e eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de reconstituição de *VEA* e *VELC*. **(A)** Estratégia para obtenção do fragmento para reconstituição do *locus* de *VEA*. **(B)** Estratégia para obtenção do fragmento para reconstituição do *locus* de *VELC*. **(C)** Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos fragmentos de reconstituição de *VEA* e *VELC*.



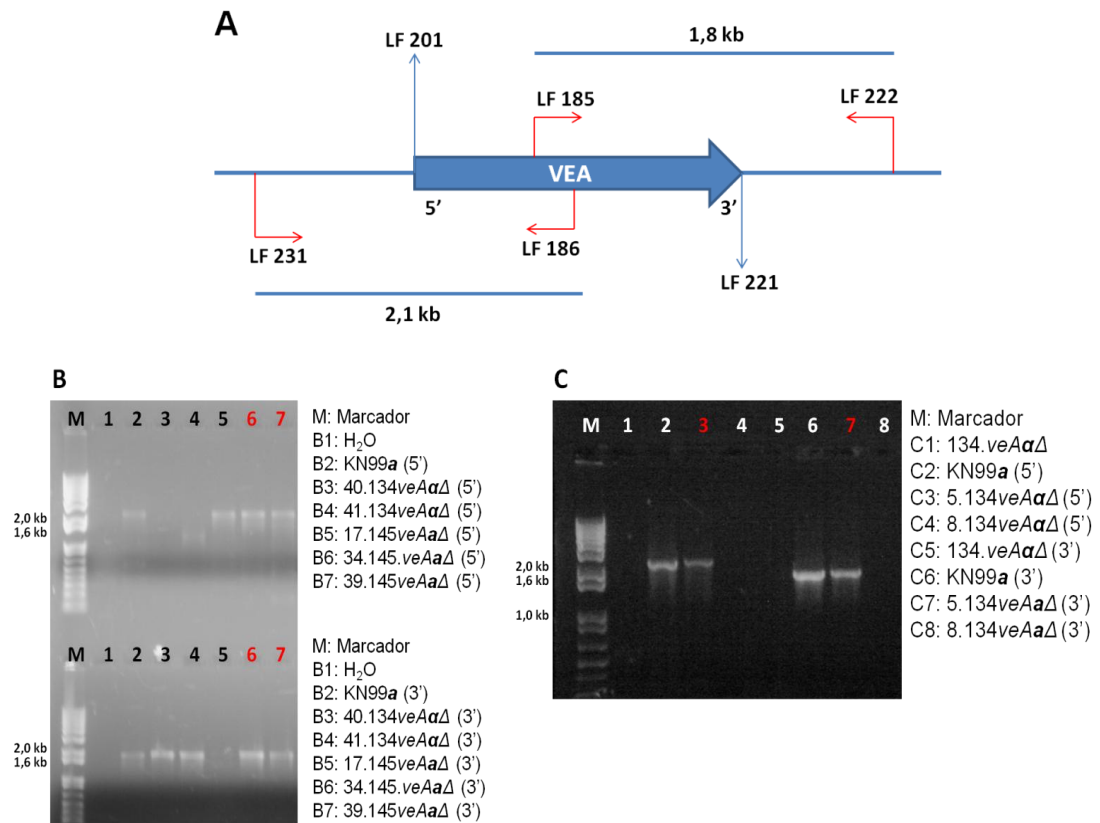
Fonte: Produção do próprio autor.

O processo inverso ao de obtenção de mutantes *veAΔ* e *velCΔ* foi realizado visando reintegrar a sequência dos genes nos seus respectivos *locus* a fim de confirmar que os defeitos observados nos mutantes são decorrentes da ausência do gene deletado. As técnicas de preparo de amostras e transformação por biobalística foram as mesmas utilizadas na obtenção de mutantes. A diferença se dá apenas na sequência que foi introduzida no fungo: a sequência do gene de interesse (*VEA* ou *VELC*). A obtenção de transformantes foi possível através da técnica de co-transformação, na qual foi realizada a transformação por biobalística do fragmento de interesse (gene de *VEA* ou *VELC*) juntamente com o plasmídeo pJAF que confere resistência a Neomicina (G418).

Para a candidatura dos possíveis reconstituídos, os mesmos deviam ser resistentes à Neomicina (marca de seleção do plasmídeo) e sensíveis à marca de

seleção antiga (*HPH* ou *NAT*). Cumprindo esses requisitos, as colônias obtidas foram submetidas à confirmação via PCR com os oligonucleotídeos LF231 + LF186 para confirmação da região 5', cujo tamanho esperado foi 2,1 Kb. E LF185 + LF222 para confirmação da região 3' e o tamanho esperado foi de 1,8 Kb (**Figura 23a**), no caso dos mutantes de *VEA*. Tais reações foram realizadas com ambos tipos sexuais (**Figura 23b e Figura 23c**).

**Figura 23** - Esquema representativo para a confirmação reconstituição do *locus* de *VEA* em *C. neoformans* e eletroforese de gel de agarose dos produtos obtidos de PCR obtidos por meio da amplificação das regiões 5' e 3' do *locus* de *VEA* em ambos os tipos sexuais. **(A)** Esquema das reações de confirmação da reintegração de *VEA* no *locus*. **(B)** Produtos 5' e 3' obtidos por meio de PCR de confirmação dos reconstituídos de *VEA* MAT $\alpha$ . **(C)** Produtos 5' e 3' obtidos por meio de PCR de confirmação dos reconstituídos *VEA* MAT $\alpha$ . Os reconstituídos confirmados por PCR estão destacados em vermelho.



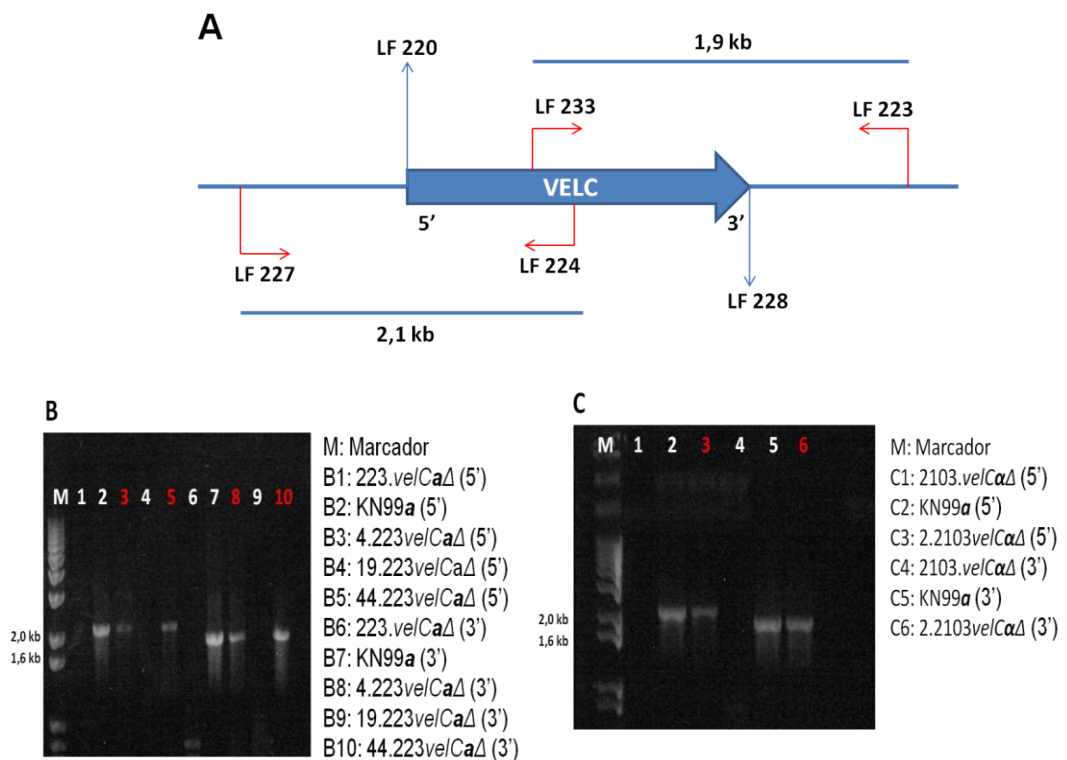
Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Foram obtidos dois reconstituídos de *veA $\alpha\Delta$* , o primeiro foi denominado *veA $\alpha\Delta$ ::VEA 1* e o segundo foi denominado *veA $\alpha\Delta$ ::VEA 2*.

Para *VELC*, utilizaram-se os mesmos requisitos para que as colônias fossem submetidas à confirmação por PCR com os oligonucleotídeos LF227 + LF186 para confirmação da região 5', cujo tamanho esperado foi 2,1 Kb. E LF185 + LF223 para

confirmação da região 3' sendo o tamanho esperado de 1,9 Kb (**Figura 24a**, **Figura 24b** e **Figura 24c**).

**Figura 24** - Esquema representativo para a confirmação reconstituição do *locus* de *VELC* em *C. neoformans* e eletroforese de gel de agarose 0,8% dos produtos obtidos de PCR obtidos por meio da amplificação das regiões 5' e 3' do *locus* de *VELC* em ambos os tipos sexuais. **(A)** Esquema das reações de confirmação da reintegração de *VELC* no *locus*. **(B)** Produtos 5' e 3' obtidos por meio de PCR de confirmação dos reconstituídos *velcΔ* MAT $\alpha$ . **(C)** Produtos 5' e 3' obtidos por meio de PCR de confirmação dos reconstituídos *velcΔ* MAT $\alpha$ . Os reconstituídos confirmados por PCR estão destacados em vermelho.



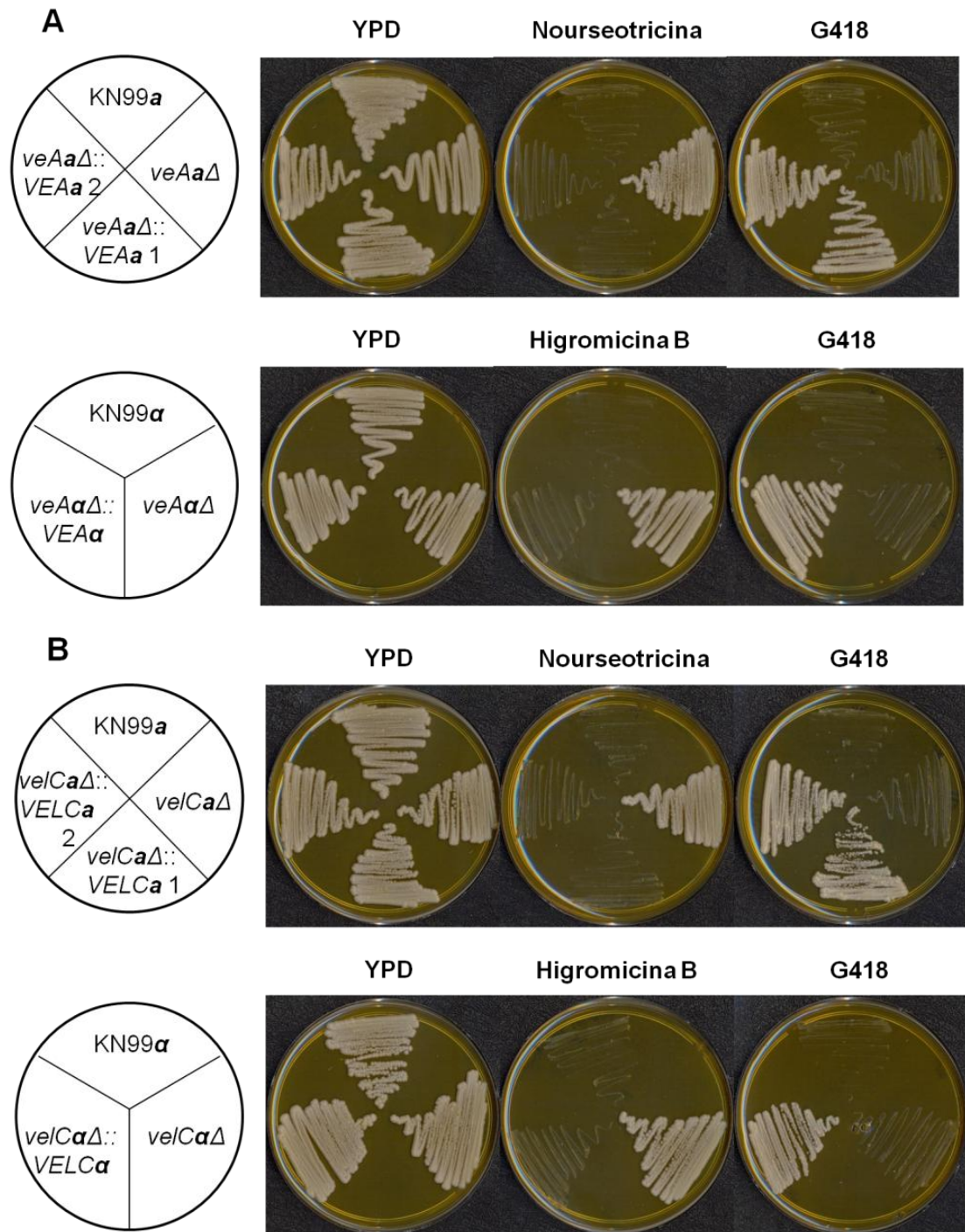
Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Foram obtidos dois reconstituídos de *velCaΔ*, o primeiro foi denominado *velCaΔ::VELC 1* e o segundo foi denominado *velCaΔ::VELC 2*.

A fim de demonstrar a estabilidade das marcas de seleção de cada cepa e comprovar que foram obtidos os reconstituídos de *VEA* e *VELC*, as cepas selvagem, mutante e reconstituída de cada gene, foram plaqueadas em meio YPD contendo a droga que corresponde à sua marca de seleção e incubadas a 30 °C por até 72 horas (**Figura 25**).



**Figura 25** - Crescimento das cepas selvagem, mutante e reconstituída nos meios com suas respectivas marcas de seleção. **(A)** Crescimento das cepas selvagem, mutante e reconstituída de ambos tipos sexuais do gene *VEA*. **(B)** Crescimento das cepas selvagem, mutante e reconstituída de ambos tipos sexuais do gene *VELC*.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Foi observado que as cepas reconstituídas perderam a resistência a Nourseotricina ou a Higromicina B como esperado, bem como as cepas selvagens

não crescem na presença das drogas Higromicina B, Nourseotricina ou Neomicina (G418) e as cepas mutantes não conseguem crescer na presença de Neomicina.

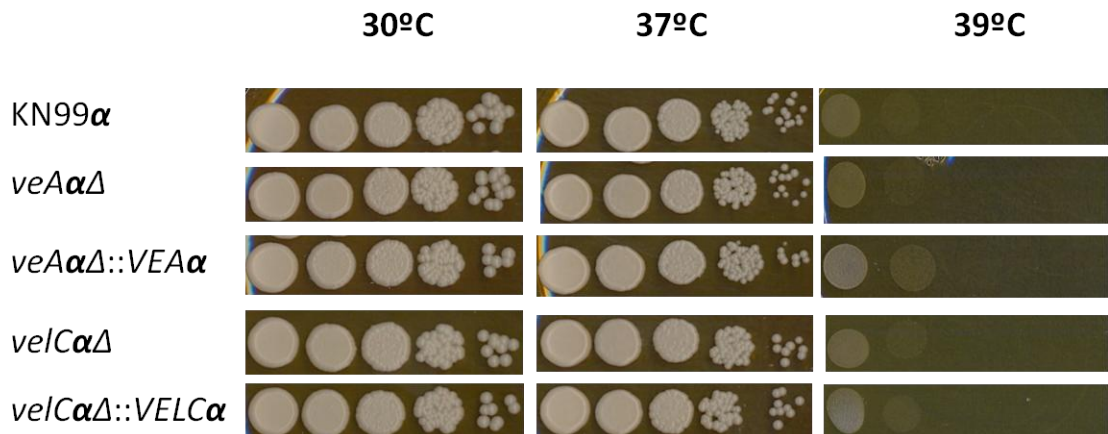
#### 4.4 Avaliação fenotípica *in vitro* de *veA* $\Delta$ e *velC* $\Delta$ e seus respectivos reconstituídos

Os mutantes e reconstituídos confirmados foram submetidos aos mais variados testes fenotípicos e de virulência de modo a analisar o papel de *VEA* e *VELC* em *C.neoformans*.

##### 4.4.1 Estresse térmico

A capacidade de crescimento em altas temperaturas, crescimento a 37 °C é uma característica fundamental para garantir a sobrevivência de um patógeno durante a infecção em um hospedeiro mamífero. As cepas selvagem, mutante e reconstituída foram avaliadas quanto à sua capacidade de crescimento a 30 °C, 37 °C e 39 °C (**Figura 26**).

**Figura 26** - Teste de estresse térmico em meio YPD em diferentes temperaturas. Diluição seriada das linhagens  $\alpha$  selvagens, mutantes e reconstituídos de *VEA* e *VELC* realizado a 30, 37 e 39°C e documentado após 48 horas.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Nenhuma alteração foi observada no padrão de crescimento ou no tempo de crescimento dos mutantes *veA* $\Delta$  e *velC* $\Delta$  em relação às cepas selvagens. Apesar da temperatura ótima de crescimento de *C. neoformans* ser 30 °C, a capacidade de crescimento a 37 °C é essencial para a sobrevivência do patógeno no hospedeiro, sendo assim os mutantes de *veA* $\Delta$  e *velC* $\Delta$  não mostraram alteração de crescimento



nesta temperatura. Até o momento, não foi reportada nenhuma evidência que a ausência de *VEA* ou *VELC* em outros fungos pudesse afetar o crescimento em altas temperaturas.

#### 4.4.2 Síntese de melanina

As cepas mutantes e selvagens foram avaliadas quanto à capacidade de sintetizar melanina em meio L-DOPA Agar (**Figura 27**).

**Figura 27** - Teste de produção de melanina.  $10^5$  células do selvagem MAT $\alpha$ , dos mutantes e reconstituídos de *VEA* e *VELC* foram plaqueadas em meio L-DOPA, incubados a 30 °C e documentados após 7 dias de incubação a 30°C.



Fonte: Produção do próprio autor.

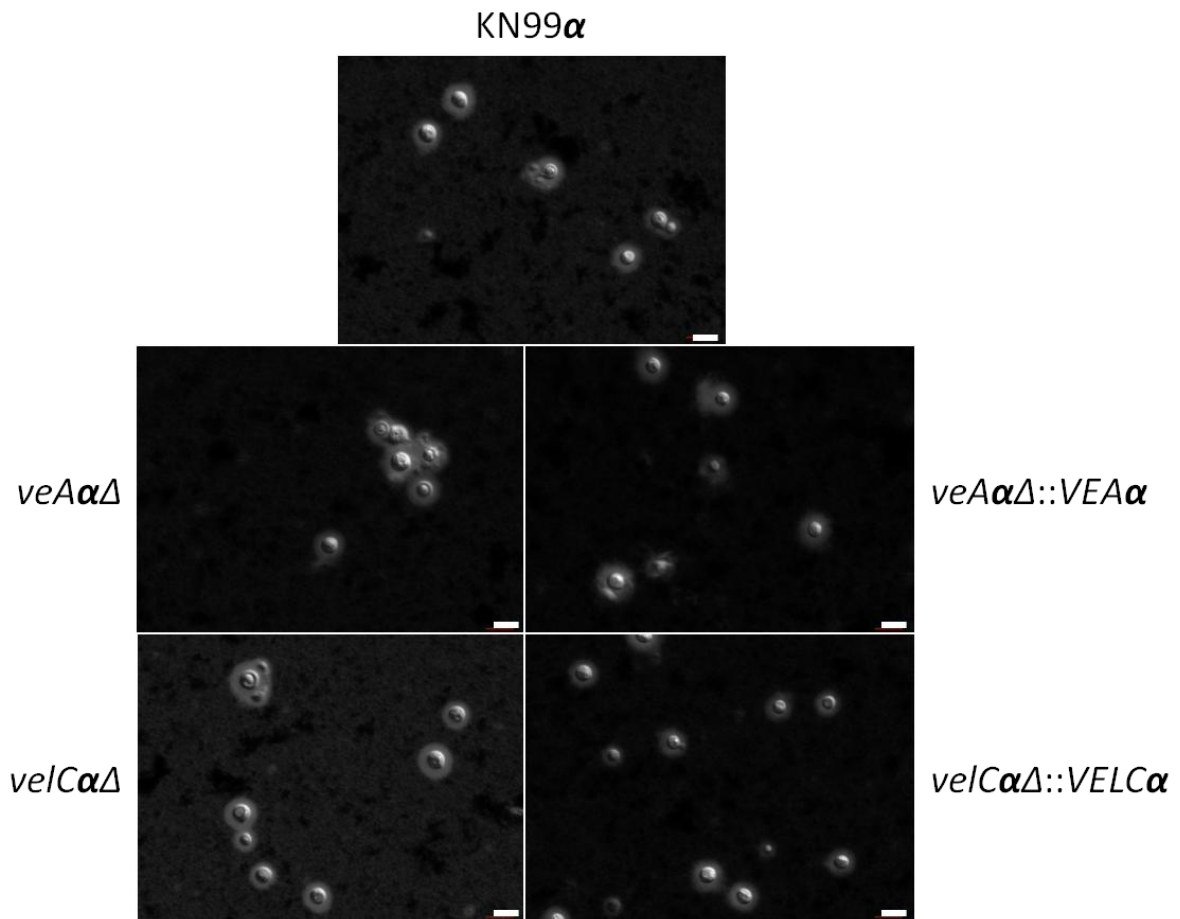
Um dos principais fatores de virulência de *C. neoformans* é a capacidade de produzir melanina a partir de compostos fenólicos, através da produção da enzima lacase ou fenoloxidase. Sendo que cepas albinas são efetivamente destruídas pelo organismo do hospedeiro (Casadevall *et al.*, 2000). No presente estudo, foi possível observar que as cepas obtidas não apresentaram diferença na produção de melanina, fato que foi corroborado realizando o mesmo teste em meio *Niger Seed* (dados não mostrados). A deleção de *VEA* em outros fungos, tais como *B. cinerea*, *A. fumigatus*, *Fusarium fujikuroi* e *Mycosphaerella graminicola* tem como resultado a alteração da pigmentação (aumento) do fungo, mostrando assim que este gene também pode estar envolvido na síntese de pigmentos como melanina e bicaverina em fungos filamentosos (Weimann *et al.*, 2010; Choi & Goodwin, 2011; Dhingra *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013).

#### 4.4.3 Produção de cápsula

Cepas selvagem, mutante e reconstituída foram incubadas em meio DMEM com MOPS, incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por até 3 dias para a

indução de cápsula. Em seguida, as amostras foram analisadas por microscopia de luz utilizando tinta nanquim (**Figura 28**).

**Figura 28** - Produção de cápsula. Selvagem, mutantes e reconstituídos de tipo sexual  $\alpha$  de cada gene foram plaqueados em meio sólido DMEM acrescido de MOPS por 3 dias de incubação a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. As lâminas foram observadas com auxílio de tinta nanquim e observadas em DIC. Barra: 10  $\mu$ m.



Fonte: Produção do próprio autor.

A cápsula polissacarídica de *C. neoformans* é um atributo de virulência importante para o fungo. Ela o protege da dissecação no meio ambiente, dos radicais livres e também o protege da fagocitose por amebas no ambiente e por macrófagos do hospedeiro. Além dessas funções, a cápsula tem importantes efeitos no sistema imunitário do hospedeiro. Mutantes com alteração no ancoramento ou produção da cápsula tem sua virulência atenuada em modelos de infecção, justificando então a sua importância neste patógeno (Janbon & Doering, 2011).

Não foi observada qualquer alteração aparente no tamanho da cápsula dos mutantes estudados, demonstrando então, que *VEA* e *VELC* possivelmente não

estão envolvidos em nenhuma via de síntese ou acoramento da cápsula polissacarídica de *C. neoformans*.

#### 4.4.4 Produção de urease

A capacidade de produzir urease foi analisada nas cepas selvagens e mutantes pelo plaqueamento em meio *Christensen's Urea Agar* (**Figura 29**).

**Figura 29** - Teste de atividade de urease em meio de Christensen. As cepas selvagem, mutante e reconstituída de *VEA* e *VELC* foram inoculadas em meio de Christensen, mantidas a 30°C e documentadas após 48 horas de incubação. A cor rosa indica atividade positiva de urease.



Fonte: Produção do próprio autor.

A urease tem sido reportada como um importante fator de virulência que está diretamente relacionado à capacidade do fungo atravessar a barreira hematoencefálica. Tal enzima aumenta o sequestro de células fúngicas por meio dos capilares durante a invasão sistêmica (Olszewski *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2010).

Mutantes de *URE1* possuem dificuldade de transpassar a barreira hematoencefálica (Cox *et al.*, 2000). Também é importante ressaltar que o correto funcionamento dos componentes da via da urease é necessário para o acometimento do sistema nervoso central, assim o mau funcionamento de um único componente acessório da ativação da mesma acarreta numa drástica redução da capacidade do fungo em afetar as junções ligantes de células da barreira hematoencefálica humana (Singh, 2013).

O meio de *Christensen* avalia a capacidade dos micro-organismos de utilizar ureia como fonte de nitrogênio. Os que a utilizam são capazes de sintetizar a enzima urease que metaboliza a ureia em amônia, aumentando assim, o pH do meio e alterando a cor para rosa. A mudança de coloração deste meio indica que a ausência de *VEA* e *VELC* não afeta a produção de urease, provavelmente não participando da regulação desta via.

#### 4.4.5 Produção de fosfolipase

A capacidade de biosíntese de fosfolipase das cepas selvagem KN99 $\alpha$ , mutante *veA $\alpha$  $\Delta$* , mutante *ve/C $\alpha$  $\Delta$*  e reconstituídos *veA $\alpha$  $\Delta$ ::VEA $\alpha$*  e *ve/C $\alpha$  $\Delta$ ::VELC $\alpha$*  de *C. neoformans* foi testada através de incubação em meio de emulsão de gema de ovo (Figura 30). Esse teste se trata de um ensaio qualitativo, não permitindo avaliar qual fosfolipase está ativada ou, no caso de formação de halo defeituoso, qual teve sua produção afetada.

**Figura 30** - Ensaio de fosfolipase em meio emulsão de gema de ovo. As cepas KN99 $\alpha$ , *veA $\alpha$  $\Delta$* , *veA $\alpha$  $\Delta$ ::VEA $\alpha$* , *ve/C $\alpha$  $\Delta$*  e *ve/C $\alpha$  $\Delta$ ::VELC $\alpha$*  a 30°C foram inoculadas em meio emulsão de gema de ovo e documentadas após 48 horas de incubação. A presença de halo opaco ao redor da colônia indica a atividade de fosfolipase.



Fonte: Produção do próprio autor.

Após a incubação e documentação da presença de halos opacos em volta das colônias, foi realizada a medição do diâmetro das colônias e dos seus respectivos halos a fim de estabelecer a atividade de fosfolipase entre as cepas utilizadas neste estudo. Para tal, foi estabelecida a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo formado, o resultado (Pz) indica a atividade de fosfolipase das cepas no qual a atividade foi considerada negativa (Pz:=1), positiva (Pz:  $\geq 0,64 < 1$ ) e fortemente positiva (Pz:  $< 0,64$ ), segundo Price e colaboradores (1982) (Tabela 5).

**Tabela 5** - Atividade de fosfolipase. Dc: diâmetro da colônia; Dcm: diâmetro do halo de precipitação.

Cepa	Dc	Dcm	Pz	Atividade
KN99 $\alpha$	1,2	2,1	0,6	Positiva
<i>VeA<math>\alpha</math><math>\Delta</math></i>	1,2	2,0	0,6	Positiva
<i>veA<math>\alpha</math><math>\Delta</math>::VEA</i>	1,3	2,1	0,61	Positiva
<i>Ve/C<math>\alpha</math><math>\Delta</math></i>	1,2	2,0	0,6	Positiva
<i>ve/C<math>\alpha</math><math>\Delta</math>::VELC</i>	1,2	2,0	0,6	Positiva

Fonte: produzido pelo autor.

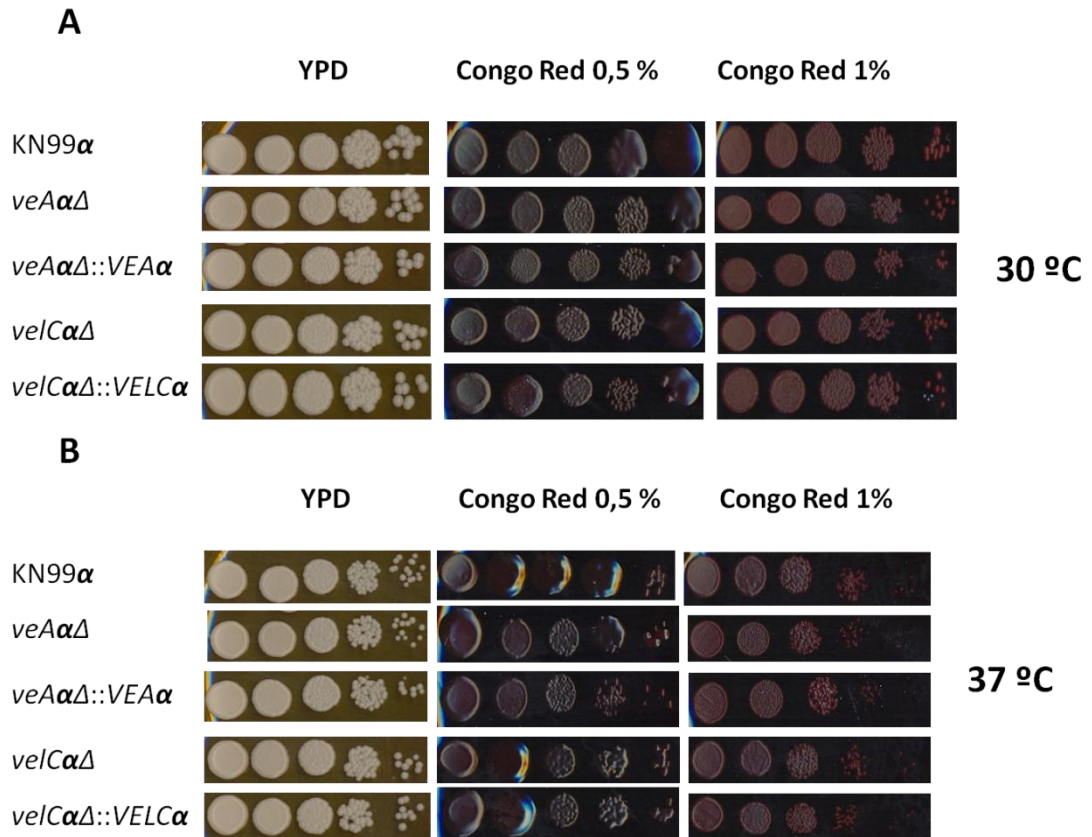
Existem cinco tipos de fosfolipases, fosfolipase A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C e D. Tal classificação se deve ao éster a ser hidrolisado. Apesar de existir estes cinco tipos, somente a fosfolipase B e fosfolipase C estão correlacionadas à patogênese de *C. neoformans* (Djordjevic, 2010).

O teste de fosfolipase em meio emulsão de gema de ovo não permite identificar qual fosfolipase está ativa, porém permite avaliar qualitativamente se uma cepa consegue ou não secretar tal enzima, logo observa-se que não houve alteração na produção de fosfolipase nas cepas testadas. A atividade de fosfolipase, bem como a secreção e atividade de outras enzimas hidrolíticas, em *Candida albicans* está intrinsecamente relacionada à patogenicidade deste fungo, logo que a secreção desta enzima permite que o fungo penetre no tecido do hospedeiro (Naglik *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2013). Em *C. neoformans* a atividade de fosfolipase tem sido relacionada à patogenicidade deste fungo, mutantes de *PLB1* são incapazes de provocar criptococose pulmonar. Até o momento, o único relato de alterações na atividade de hidrolases secretadas em mutantes de *VEA*, foi somente quando este gene é deletado em *A. fumigatus*, tendo como consequência a redução da atividade de proteases (Dhingra *et al.*, 2012). Diferentemente de *VEA*, não há relatos da participação de *VELC* na atividade ou secreção de hidrolases em outros fungos.

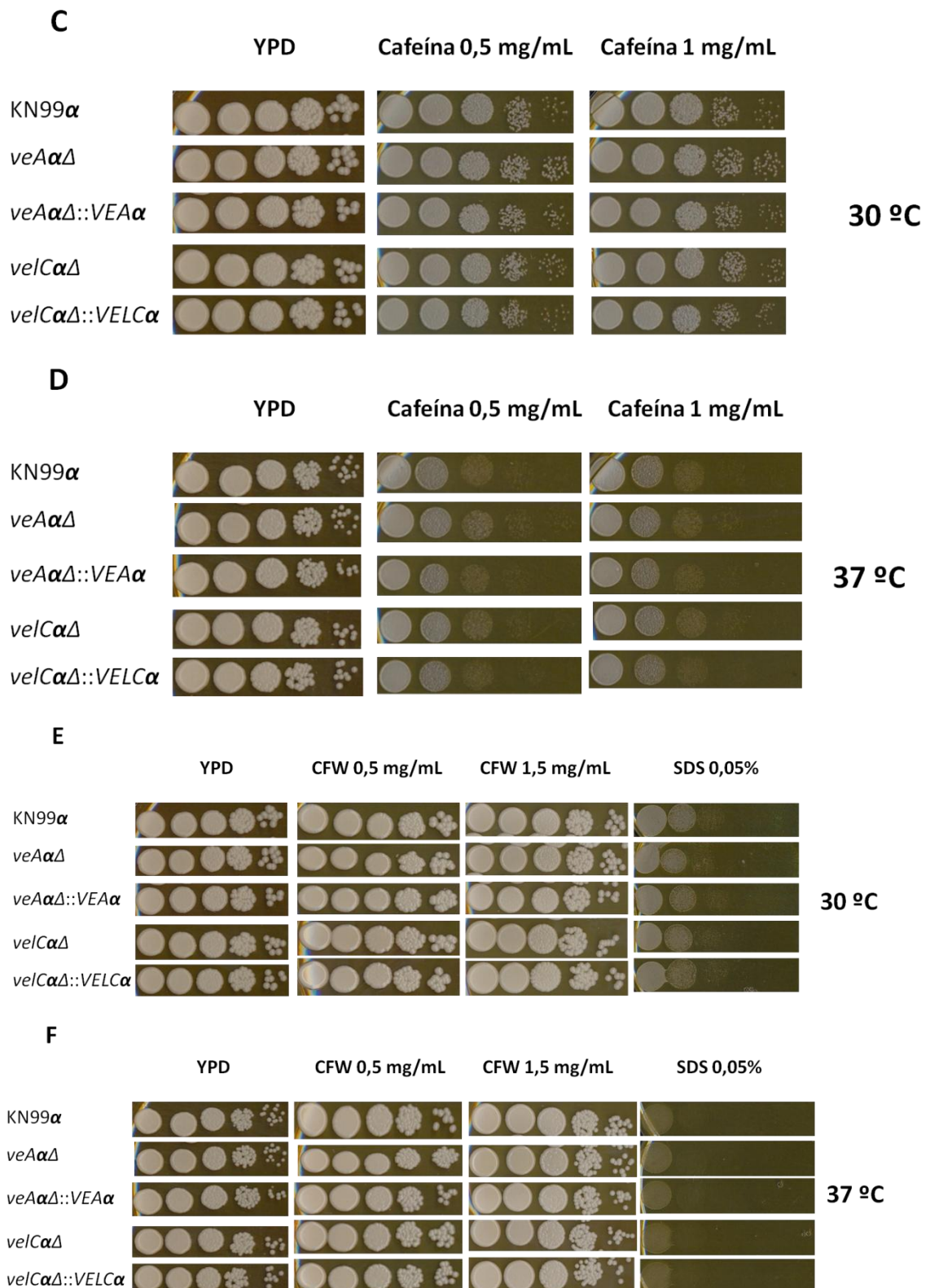
#### 4.4.6 Integridade da parede celular

A fim de verificar se *VEA* ou *VELC* participam de vias relacionadas à manutenção da integridade da parede celular, foram realizados testes em diversos meios indicadores de defeitos na estrutura da parede celular e membrana celular em ambas as temperaturas, 30 °C e 37 °C. Foi observado que os genes supracitados não participam de tais vias, em vista que não foram observadas alterações dos mutantes e reconstituídos em relação ao selvagem (**Figura 31**).

**Figura 31** - Teste de estresse de parede utilizando diferentes estressores em diferentes temperaturas. **(A)** Estresse de parede em meio Congo Red 0,5 e 1% a 30 °C. **(B)** Estresse de parede em meio Congo Red 0,5 e 1 % a 37 °C. **(C)** Estresse de parede em meio acrescido de 0,5 e 1 mg/mL de Cafeína a 30 °C. **(D)** Estresse de parede em meio acrescido de 0,5 e 1 mg/mL de Cafeína a 37 °C. **(E)** Estresse de e parede em meio acrescido de 0,5 e 1,5 mg/mL de Calcofluor White e SDS a 0,05% a parede 30 °C. **(F)** Estresse de parede em meio acrescido de 0,5 e 1,5 mg/mL de Calcofluor White e SDS a 0,05% a 37°C.







Fonte: Produção do próprio autor.

Não foi observado qualquer tipo de sensibilidade das cepas testadas em meios estressores de parede como *Congo Red*, cafeína, calcofluor *White* e SDS, indicando assim, que a ausência de *VEA* ou *VELC* não perturba a parede celular de

*C. neoformans*, podendo-se inferir que estes genes podem não estar correlacionados às vias de manutenção de parede celular.

Mutantes que não conseguem crescer em meio *Congo Red* são um indício de defeitos em genes que codificam a  $\beta$ -1,3 glucana sintase enquanto o Calcofluor *White* se liga especificamente à quitina (Roncero & Durán, 1985; Liu *et al.*, 2011). A alteração de crescimento em SDS por sua vez, indica a desestabilização das proteínas e a alteração no crescimento em meio contendo cafeína é um indicativo de defeitos na via de síntese da parede celular (Siafakas *et al.*, 2007).

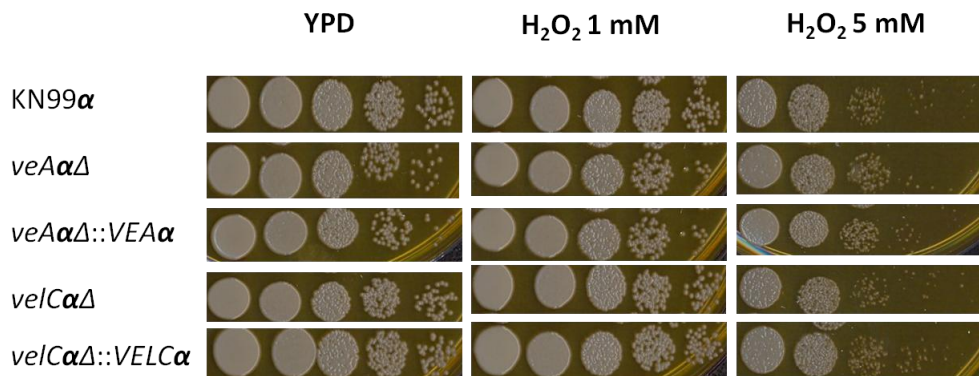
Em outros fungos, a deleção de *VEA* pode vir a ocasionar redução da hidrofobicidade da colônia ou alterações na parede celular, sendo que este fenótipo pode ser restaurado quando na presença de estabilizadores osmóticos como observado em *Mycosphaerella graminicola* e *F. verticillioides*. Em contrapartida, a deleção de *VEA* em *Fusarium graminearum* promove a resistência aos estressores de parede e estressores osmóticos (Li *et al.*, 2006; Myung *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2011; Choi & Goodwin, 2011; Merhej *et al.*, 2012). Até o momento, o único fenótipo de defeitos na parede celular atribuídos à *VELC* foi a *Magnaporthe oryzae* no qual foi observados defeitos na parede celular da apressoria deste fungo, tendo como consequência a redução da virulência desta cepa em folhas de arroz (Kim *et al.*, 2014).

#### 4.4.7 Estresse oxidativo

Da mesma forma, o efeito do estresse oxidativo sobre as linhagens do presente estudo, foi testado em meio YPD acrescido de peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações a 30 °C. A incubação das cepas em diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio não provocou qualquer alteração ou retardo do crescimento de células mutantes em relação às selvagens e reconstituídas (**Figura 32**).



**Figura 32** - Ensaio de estresse oxidativo em meio YPD acrescido de 1 mM e 5 mM peróxido de hidrogênio. Diluição seriada das linhagens selvagens, mutantes e reconstituídos de *VEA* e *VELC* realizado a 30°C e documentado após 48 horas.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

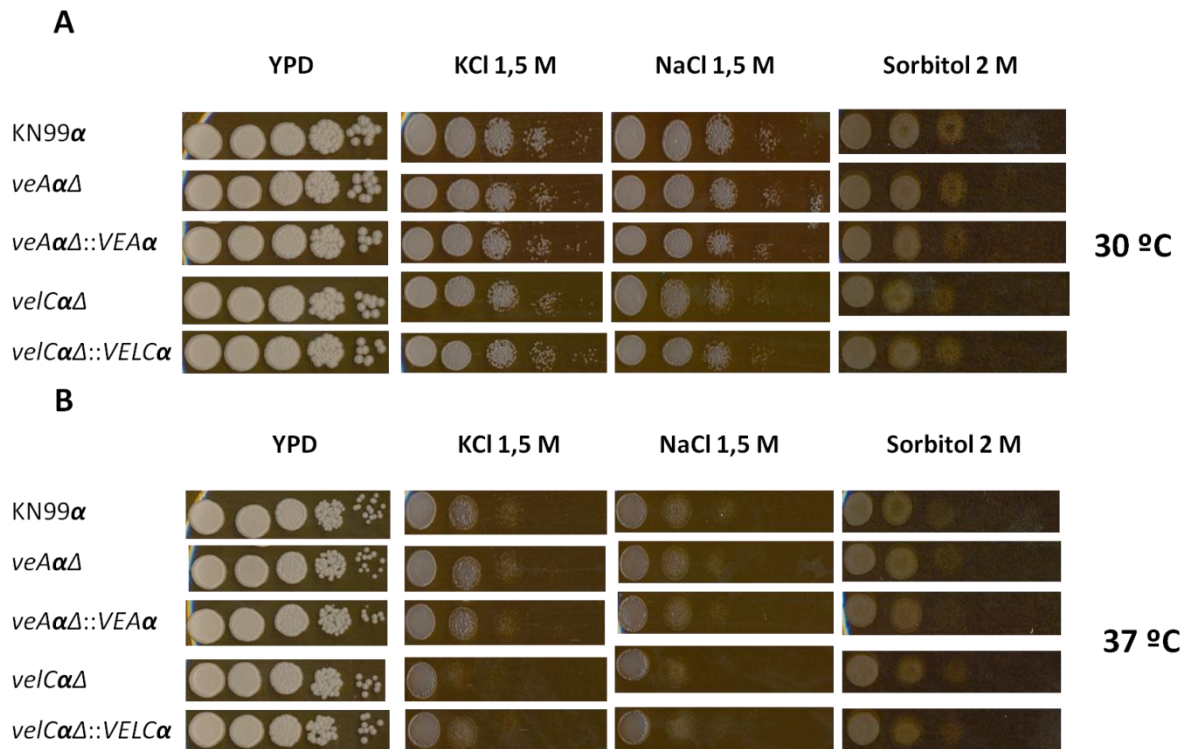
Sendo *C. neoformans* um patógeno intracelular facultativo, capacidade de, sobreviver aos radicais livres dos macrófagos é essencial para a patogênese deste microrganismo (Feldmesser *et al.*, 2000; Feldmesser *et al.*, 2001).

Foi observado que mesmo com o aumento na concentração de peróxido de hidrogênio, as leveduras mutantes de *VEA* ou *VELC* não apresentaram alterações no crescimento na presença deste agente. Em *B. cinerea* foi reportado que a ausência de *VEA* faz com que os conídios do fungo se tornem mais suscetíveis ao estresse oxidativo quando submetido a concentrações a partir de 5 mM a 8 mM de peróxido de hidrogênio (Yang *et al.*, 2013).

#### 4.4.8 Estresse osmótico

O efeito do estresse osmótico sobre as linhagens selvagens, mutantes e reconstituídas foi avaliado com auxílio de alguns estressores em diferentes concentrações e diferentes temperaturas. A incubação das linhagens em diferentes temperaturas na presença destes agentes estressores não provocou qualquer alteração ou retardo do crescimento de células mutantes em relação às linhagens selvagens e reconstituídas, indicando que os genes *VEA* e *VELC* não apresentam qualquer alteração na estabilidade da membrana plasmática (**Figura 33**).

**Figura 33** - Teste de estresse osmótico das linhagens selvagem, mutante e reconstituída dos genes *VEA* e *VELC*. **(A)** Diluição seriada das linhagens selvagens, mutantes e reconstituídos de *VEA* e *VELC* realizado a 30 °C e documentado após 48 horas. **(B)** Diluição seriada das linhagens selvagens, mutantes e reconstituídos de *VEA* e *VELC* realizado a 37 °C e documentado após 48 horas.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

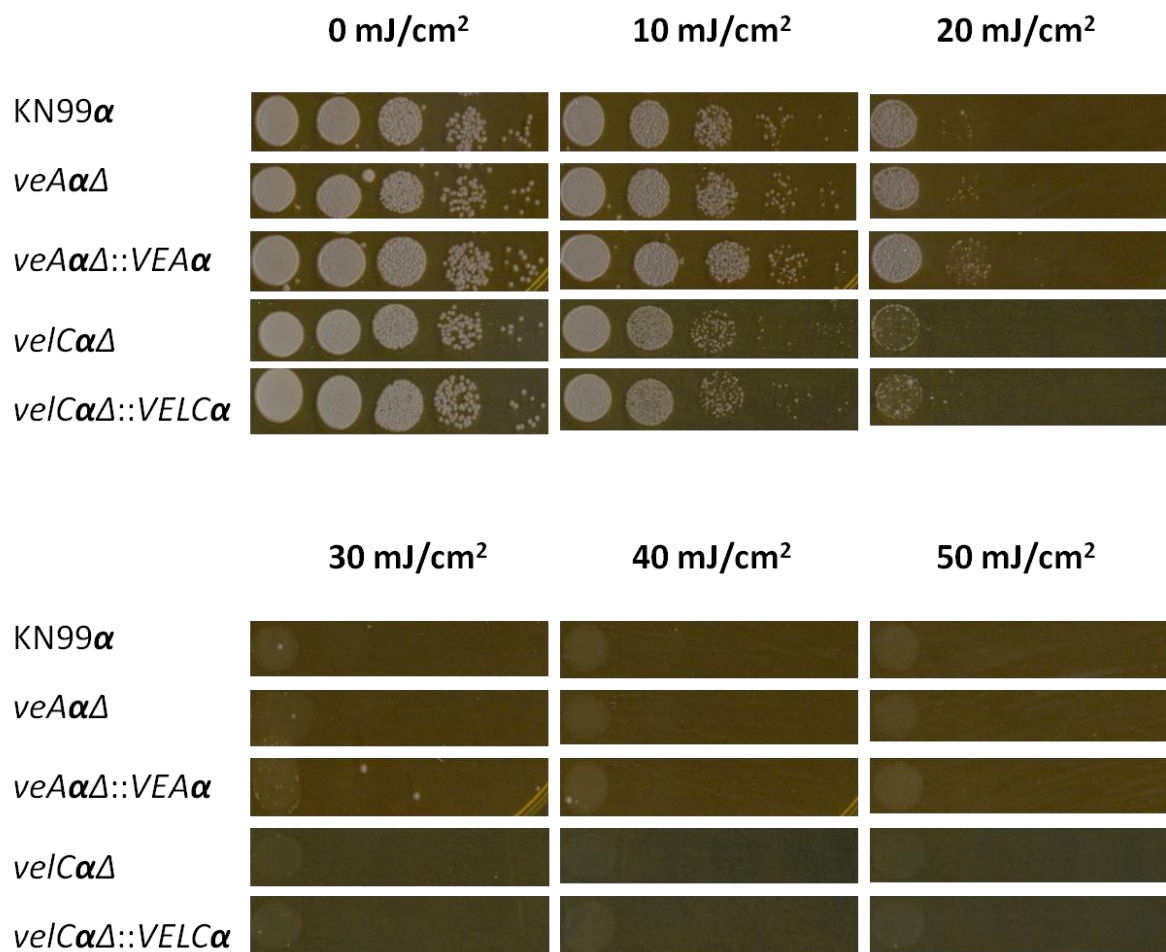
A ausência de defeitos nas colônias mutantes sugere que não houve alteração aparente na permeabilidade da membrana e da parede celular quando em contato com os estressores utilizados. A intolerância ao estresse osmótico está intimamente relacionada às alterações em componentes da membrana celular (Petkova *et al.*, 2010).

#### 4.4.9 Resistência à luz UV

Em 2005, Idnurm e Heitman identificaram dois genes que codificam proteínas que possuem função fotorreceptora (*BWC1* e *BWC2*) por meio de mutagênese insercional em *C. neoformans*. Um dos fenótipos observados após a deleção de *BWC1*, *BWC2* ou ambos os genes, foi a hipersensibilidade a luz UV quando as células são irradiadas com 48 mJ/cm<sup>2</sup>, tal fenótipo foi restaurado após a reconstituição dos mutantes, atribuindo assim a função de resistência à luz UV as proteínas *White collar 1* e *2* em *C. neoformans*. Também se sabe do envolvimento de outros *velvets* (*VosA*) com a sensibilidade à luz UV. Fez-se necessário verificar

se ambos genes participam da resistência à luz UV. Devido ao fato de terem sido utilizadas as linhagens do sorotipo D no estudo de *BWC1* e *BWC2*, e foram irradiadas doses de 10 a 50 mJ/cm<sup>2</sup> nas cepas selvagem, mutante e reconstituída de *VEA* e *VELC* deste estudo, no qual o background utilizado foi o sorotipo A, porém não foi observada diferença entre as cepas nas mais variadas doses (**Figura 34**).

**Figura 34** - Teste resistência à luz UV. Foram irradiadas doses de 10 a 50 mJ/cm<sup>2</sup> de UV com o auxílio do UV Crosslinker- FB-UVXL-1000 nas linhagens selvagem, mutante e reconstituída de das células  $\alpha$  de *VEA* e *VELC* inoculadas em YPD ágar, incubadas a 30°C por 48 horas.



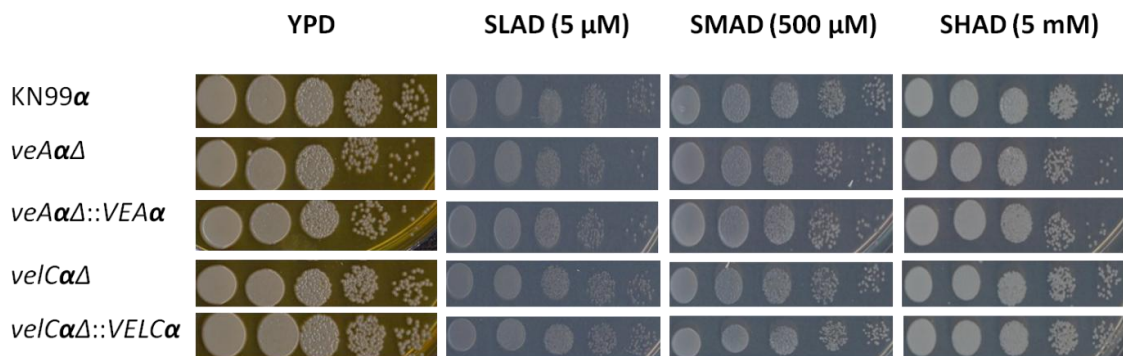
Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Não foi verificada sensibilidade ou resistência dos mutantes deste estudo à luz UV, que seguiram o padrão do selvagem. Sugerindo assim, que *VEA* ou *VELC* não estão envolvidos na resistência à luz UV.

#### 4.4.10 Crescimento em diferentes concentrações de Nitrogênio

Um dos principais estímulos que promovem o acasalamento em *C. neoformans* é a baixa disponibilidade de nitrogênio no meio extracelular. A fim de verificar se *VEA* e *VELC* possuem alguma alteração no sensoriamento de nitrogênio, as cepas obtidas neste estudo foram incubadas em meios com diferentes concentrações do mesmo (**Figura 35**).

**Figura 35** - Teste de crescimento dos selvagens, mutantes e reconstituídos de *VEA* e *VELC* em meios com diferentes concentrações de Nitrogênio. Diluições seriadas de cada uma das cepas foi plaqueada em meios contendo de 5 $\mu$ M a 5mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de nitrogênio.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

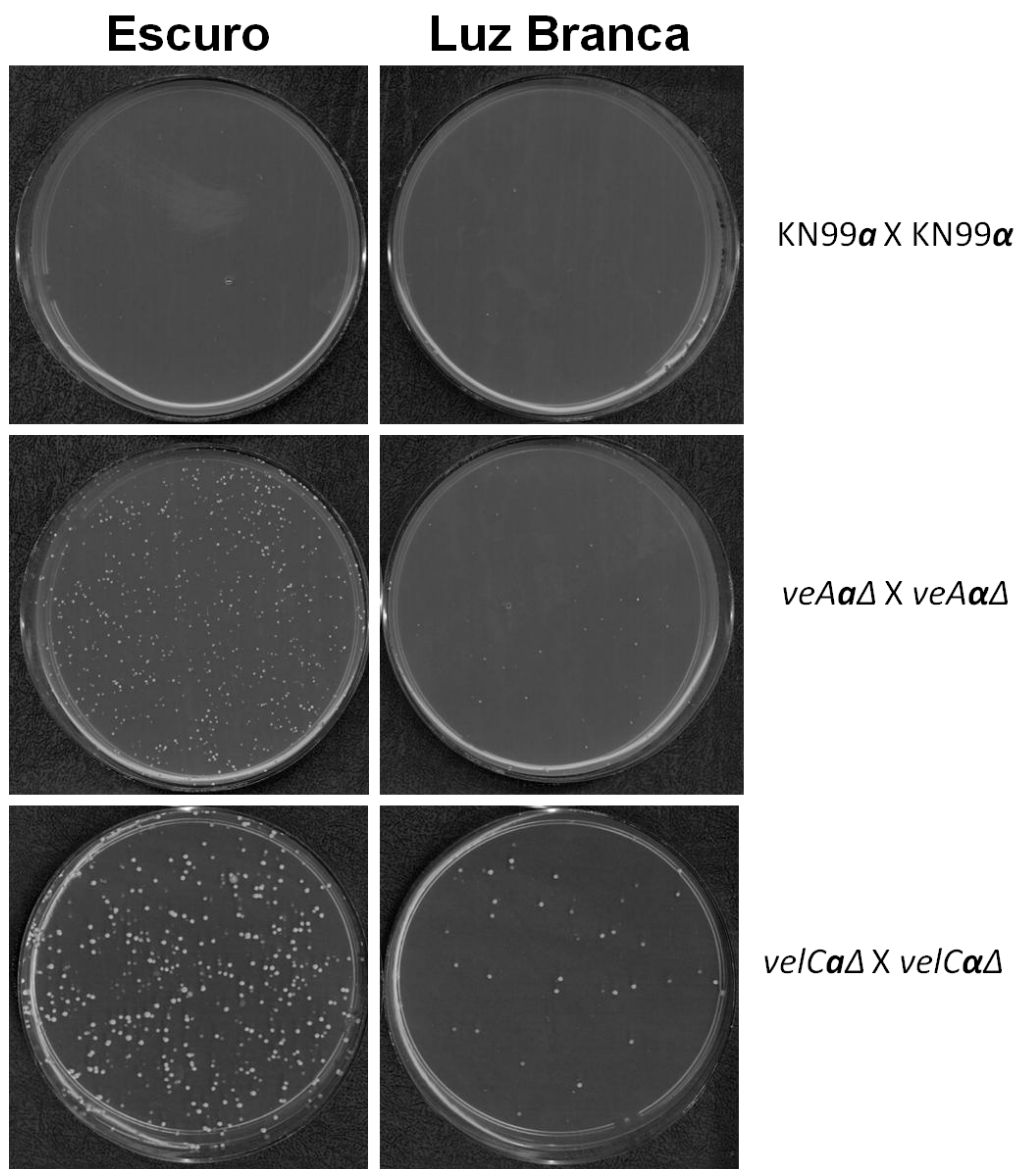
O nitrogênio é uma molécula necessária para a sobrevivência de diversos micro-organismos, mas assimilar quantidades suficientes para as suas necessidades nem sempre pode ser alcançada por meio do nitrogênio presente na atmosfera, logo se faz necessário assimilar fontes reduzidas de nitrogênio por meio de outros recursos presentes no ambiente, tais como amônio e glutamina (Lee *et al.*, 2011).

Neste experimento, não foi observada qualquer alteração no sensoriamento de nitrogênio pelos mutantes e reconstituídos de *VEA* e *VELC* em relação à cepa selvagem.

#### 4.4.11 Teste de Fusão

Para verificar se a deleção de *VEA* ou *VELC* prejudica a fusão celular, o teste de fusão foi conduzido com cruzamentos bilaterais de selvagens e mutantes de tipos sexuais opostos (**Figura 36**).

**Figura 36** - Teste de fusão com os cruzamentos bilaterais de selvagens e mutantes de *VEA* e *VELC* incubados em meio MS na ausência e presença de luz branca. Após 24 horas de co-cultivo as células foram recuperadas por agitação vigorosa, uma alíquota de 200  $\mu$ L de cada cruzamento foi plaqueada em meio YPD acrescido com 200  $\mu$ g/mL de Higromicina B e Nourseotricina. As placas foram documentadas após 5 dias de crescimento a 30 °C.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Foi constatado que a perda dos genes *VEA* ou *VELC* não extingue a fusão celular. Devido à falta de um controle positivo, não foi possível quantificar se houve aumento ou diminuição dos eventos de fusão nos mutantes em relação ao selvagem, logo só podemos afirmar que a ausência de *VEA* ou *VELC* não prejudica a fusão celular em *C. neoformans*. A taxa de fusão celular é estabelecida por meio da contagem de colônias que sofreram fusão (heterocácion ou monocácion), tendo o cruzamento selvagem (transformados com as marcas de seleção) como referência (100%) (Fu *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2011).

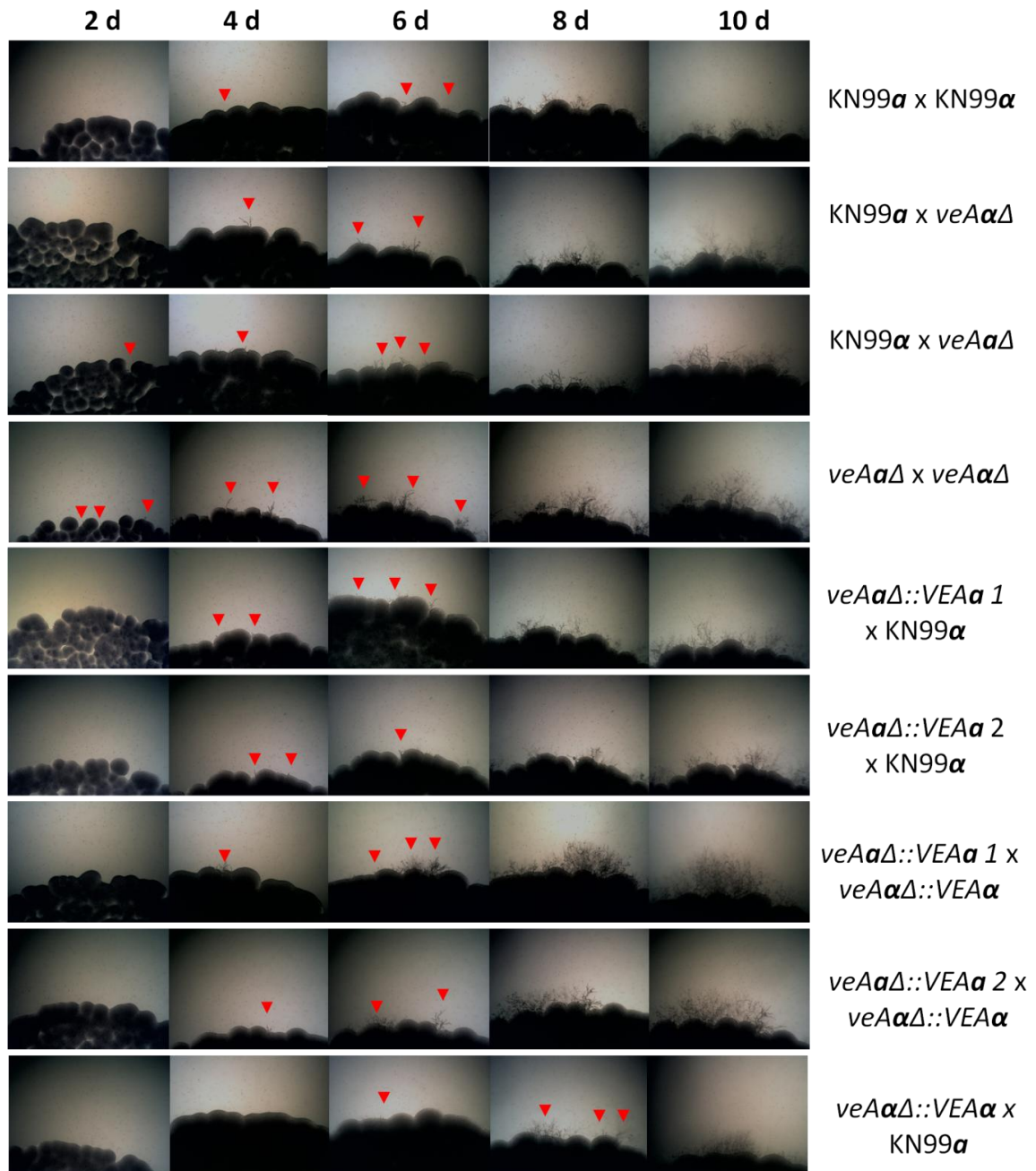
Apesar de haver um fator que reprime a fusão celular, há relatos que ainda podem ocorrer poucos eventos de fusão na presença de luz (Lu *et al.*, 2005).

#### 4.4.12 Acasalamento

Na natureza, *C. neoformans* é encontrado como na forma de levedura haploide, porém quando este encontra um parceiro sexual oposto e também em resposta a estímulos ambientais específicos, tal como a limitação nutricional, ocorre o acasalamento. A fim de verificar possíveis alterações no processo de acasalamento dos mutantes de *VEA* e *VELC*, os mesmos foram incubados em meios de cultura que mimetizam as condições ideais para o acasalamento. A seguir, serão apresentados os resultados obtidos com os mutantes de *VEA* (**Figuras 37-40**).



**Figura 37** - Acasalamento entre as cepas selvagem, mutante e reconstituídas de *VEA* acompanhadas diariamente em meio Filament Agar por até 10 dias na ausência de luz. As fotos foram tiradas em magnificação de 40x. Os triângulos vermelhos indicam o aparecimento de hifas nas bordas das colônias.

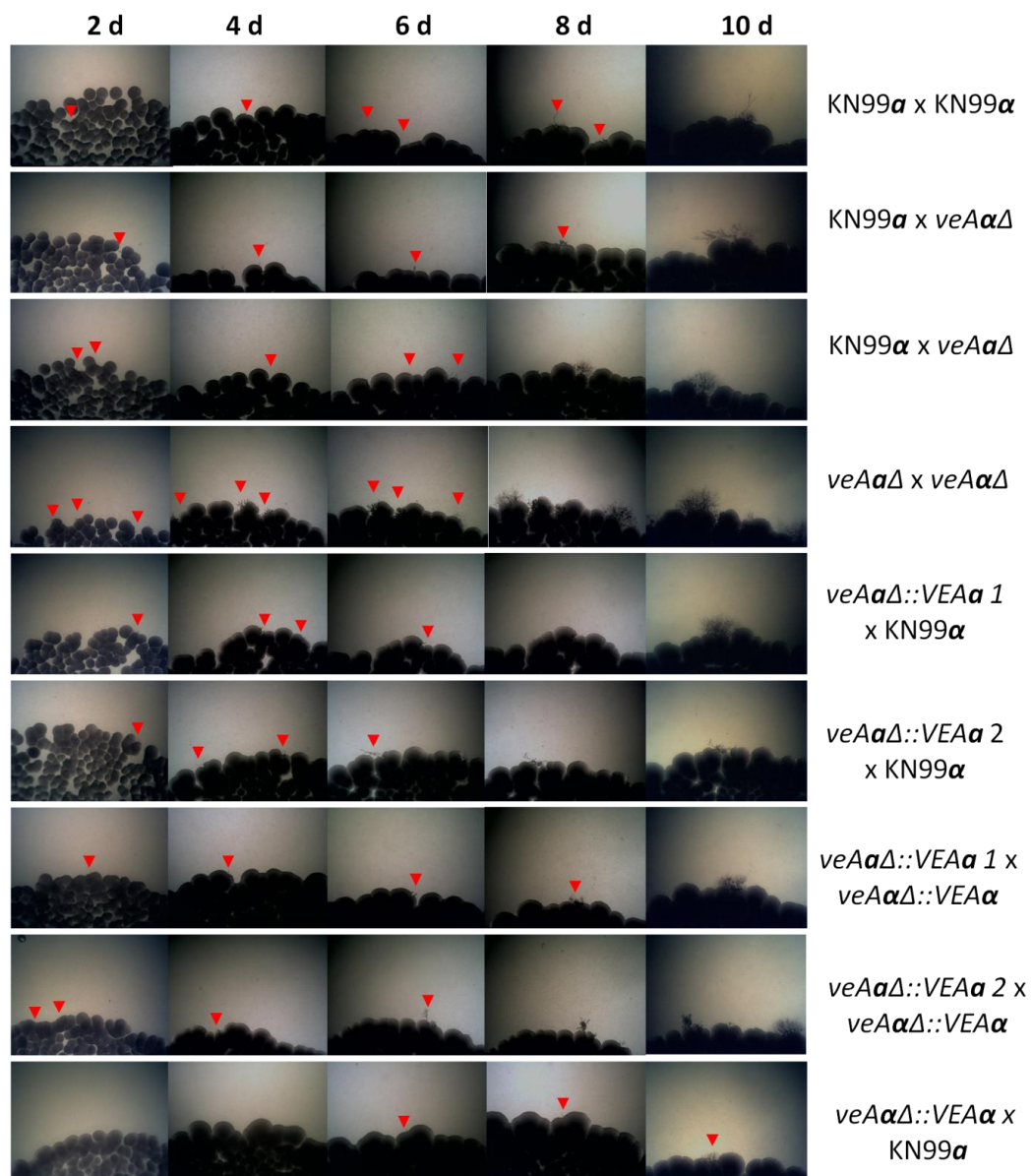


Fonte: Produzido pelo próprio autor.

O Filament Agar se trata de um meio relativamente pobre em fontes de carbono e nitrogênio e, por isso, amplamente utilizado para o estudo de filamentação haploide e acasalamento em *C. neoformans* (Wickes *et al.*, 1996; Idnurm & Heitman, 2005; Lu *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2011).

Em meio Filament Agar, na ausência de luz, foi observado que os mutantes de *VEA* iniciam a produção de hifas a partir do segundo dia de co-cultivo, enquanto cruzamento dos selvagens inicia a produção das hifas a partir do quarto dia de co-cultivo. Os reconstituídos, por sua vez, apresentam a formação de hifas também a partir do quarto dia de co-cultivo, indicando assim, que as cepas reconstituídas de fato retornaram ao fenótipo do selvagem.

**Figura 38** - Acasalamento entre as cepas selvagem, mutante e reconstituídas de *VEA* acompanhadas diariamente em meio MS por até 10 dias na ausência de luz. As fotos foram tiradas em magnificação de 40x. Os triângulos vermelhos indicam o aparecimento de hifas nas bordas das colônias.

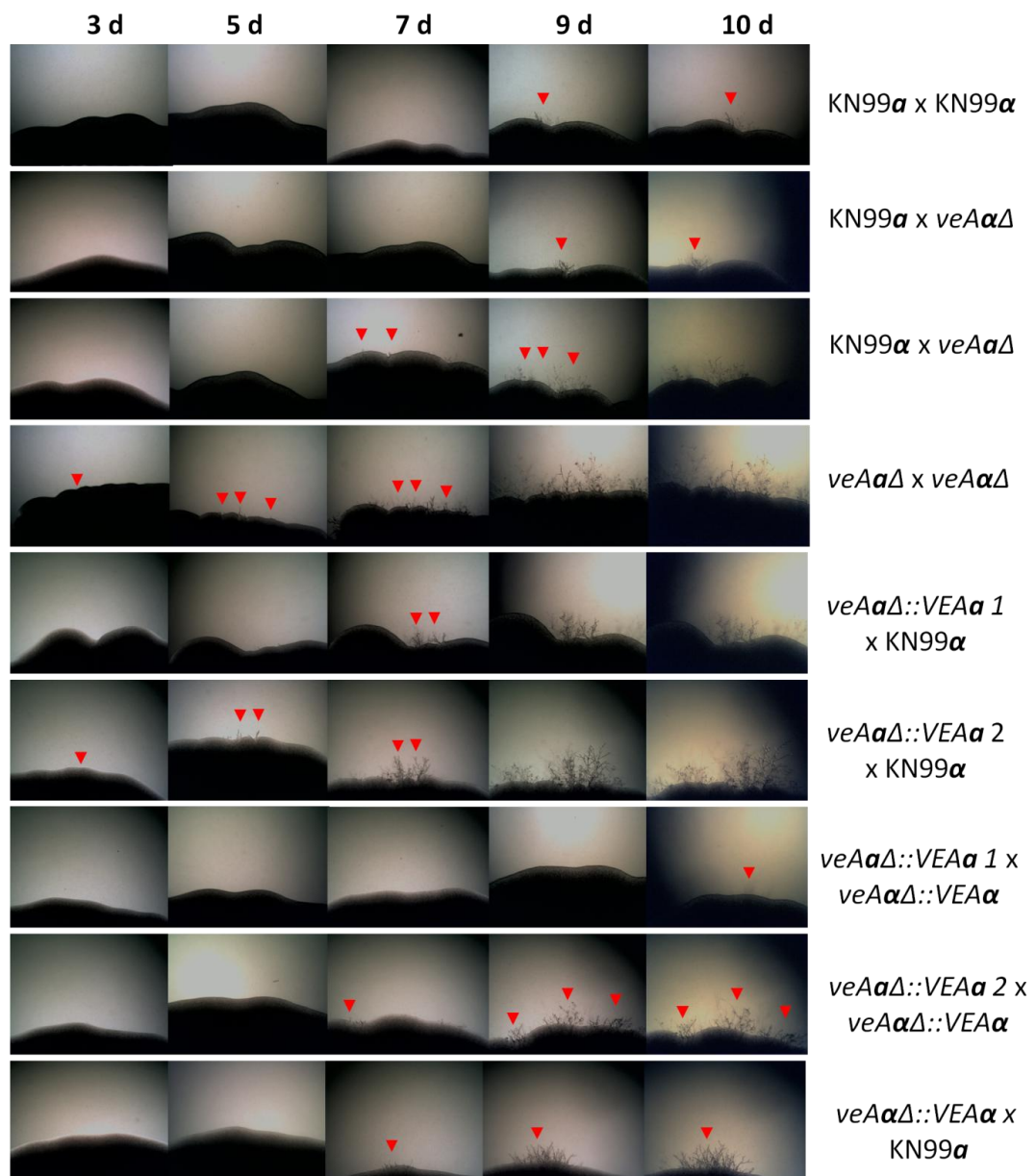


Fonte: Produzido pelo próprio autor.



Foi observado que em meio MS, o cruzamento bilateral entre os mutantes apresenta vários focos de início de formação de hifas a partir do segundo dia de co-cultivo. Apesar do selvagem também apresentar início de formação de hifas, a frequência em que tais estruturas são observadas é reduzida em relação ao mutante em questão.

**Figura 39** - Acasalamento entre as cepas selvagem, mutante e reconstituídas de VEA acompanhadas diariamente em meio SLAD por até 10 dias na ausência de luz. As fotos foram tiradas em magnificação de 40x. Os triângulos vermelhos indicam o aparecimento de hifas nas bordas das colônias.

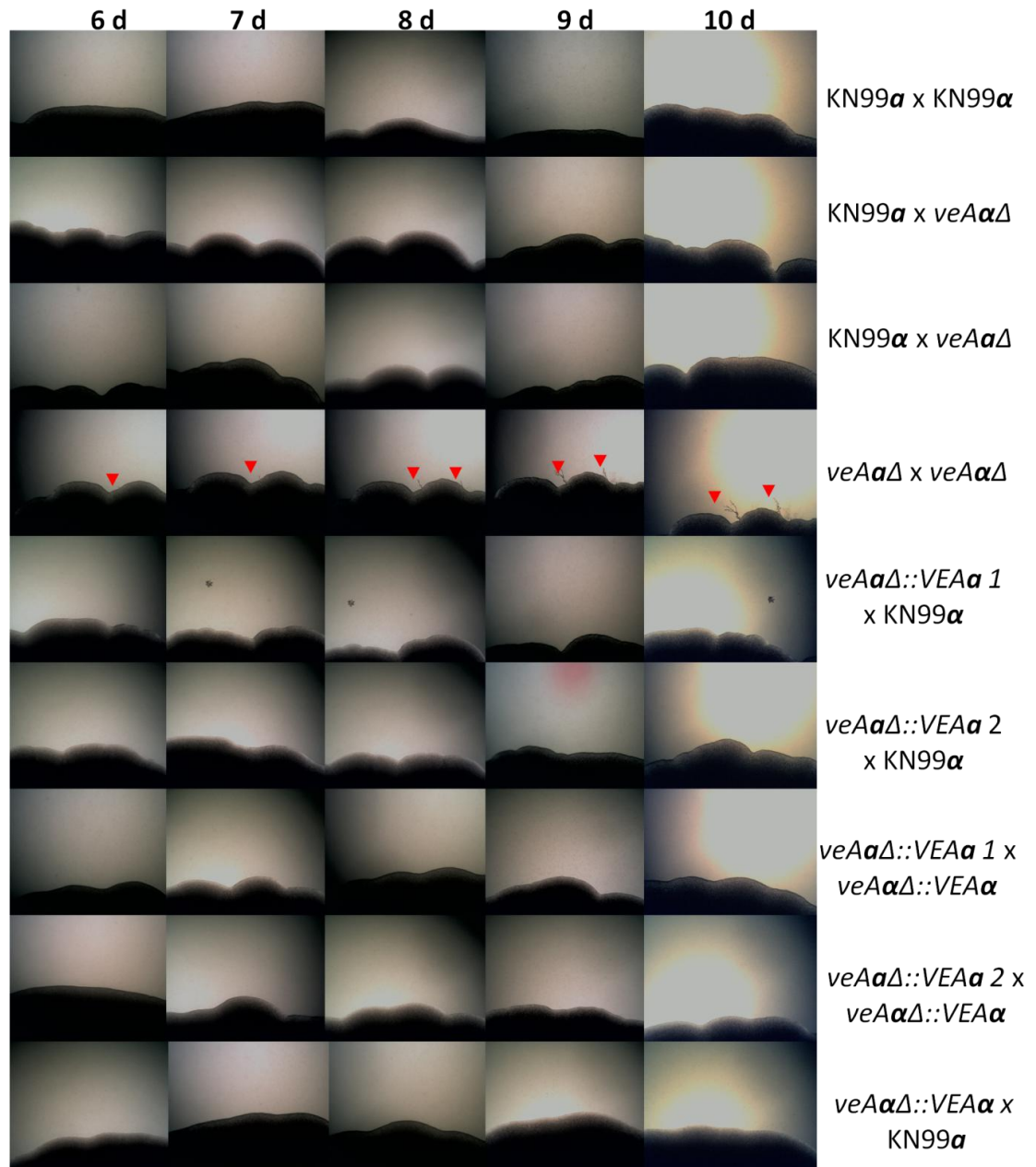


Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Em meio SLAD, também foi observada a produção precoce de hifas dicarióticas que consistem em hifas que contem material genético proveniente das células parentais nas cepas mutantes de *VEA*, corroborando assim com os resultados obtidos em Filament Agar e MS em que, também, os reconstituídos obtidos retornam ao fenótipo do selvagem, pode-se afirmar que a ausência de *VEA* resulta no fenótipo de *hipermating* ou acasalamento precoce nas condições ideais (escuro).

Tendo em vista o fenótipo de *hipermating* nas cepas *veAΔ*, sabendo do papel de *VEA* no sensoriamento de luz em *A. nidulans*, por meio de interação da proteína *VeA* com o complexo fotorreceptor neste mesmo fungo, que o processo de desenvolvimento sexual de *A. nidulans* ocorre principalmente na ausência de luz e que esta é um estímulo repressor deste processo (Mooney & Yager, 1990; Stinnett *et al.*, 2007; Bayram *et al.*, 2010; Extebeste *et al.*, 2010; Sarikaya Bayram *et al.*, 2010 ), foram realizados os mesmos experimentos de acasalamento na presença de luz branca, mesmo sabendo que este fator reprime o acasalamento em *C. neoformans* (Bahn *et al.*, 2007; Lin, 2009) (**Figura 41**).

**Figura 40** - Acasalamento entre as cepas selvagem, mutante e reconstituídas de *VEA* acompanhadas diariamente em meio SLAD por até 10 dias na presença de luz. As fotos foram tiradas em magnificação de 40x. Os triângulos vermelhos indicam o aparecimento de hifas nas bordas das colônias.



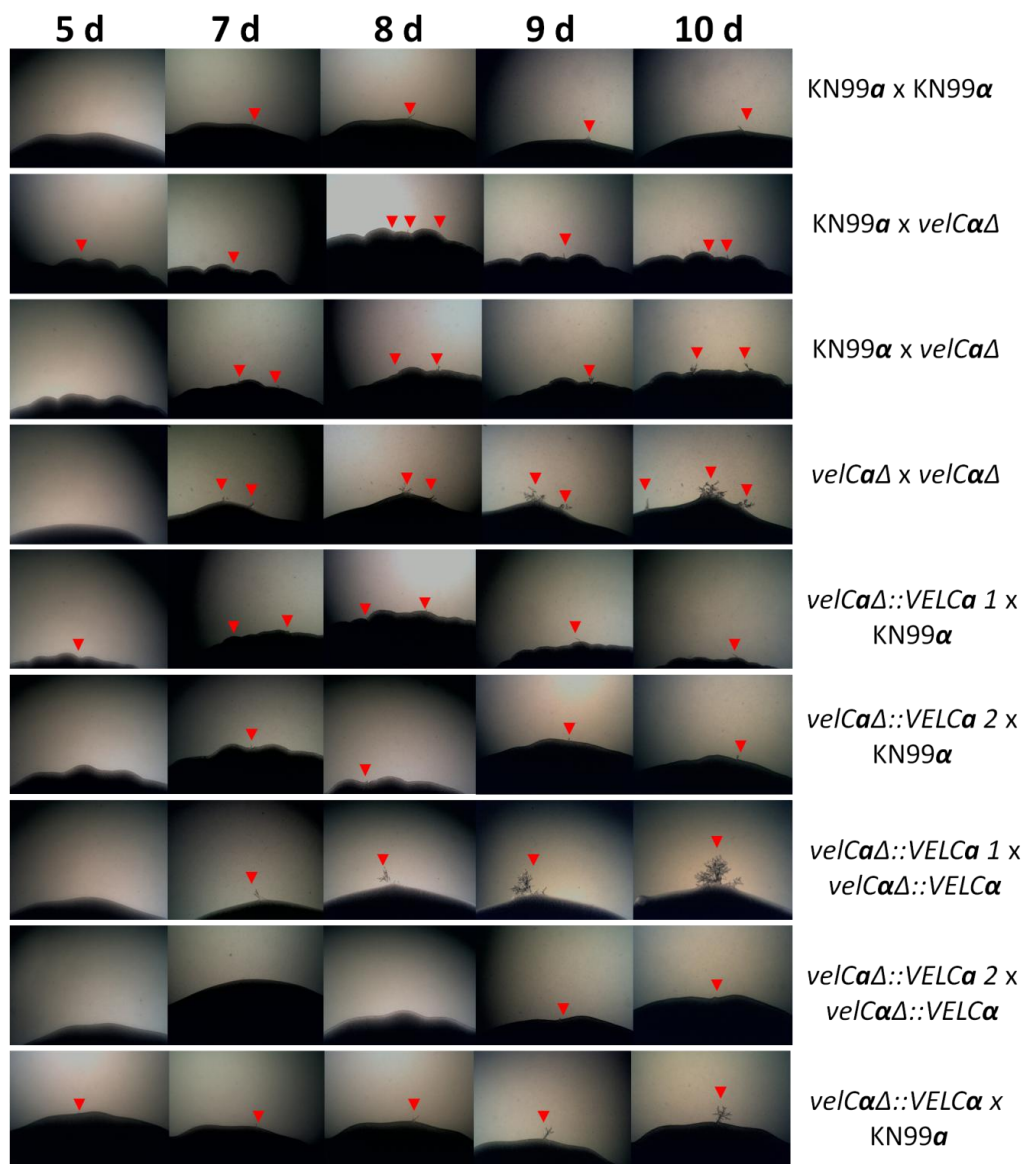
Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Foi observada a presença de hifas nas bordas do cruzamento entre os mutantes de *VEA* a partir do sexto dia de co-cultivo na presença contínua de luz branca, as quais não foram observadas nos cruzamentos bilaterais entre selvagens e mutantes e também nos reconstituídos, podendo-se afirmar que *VEA* participa no processo de sensoriamento de luz.

Em *C. neoformans*, a deleção das proteínas *White collar 1* e *2*, tem como efeito a insensibilidade à luz. Os mutantes destas proteínas conseguem realizar a fusão celular e o acasalamento mesmo com a presença de luz (Idnurm & Heitman, 2005; Lu *et al.*, 2005). Em vista do fenótipo observado, é possível que *VEA* possua alguma relação com a via de sensoriamento de luz em *C. neoformans*.

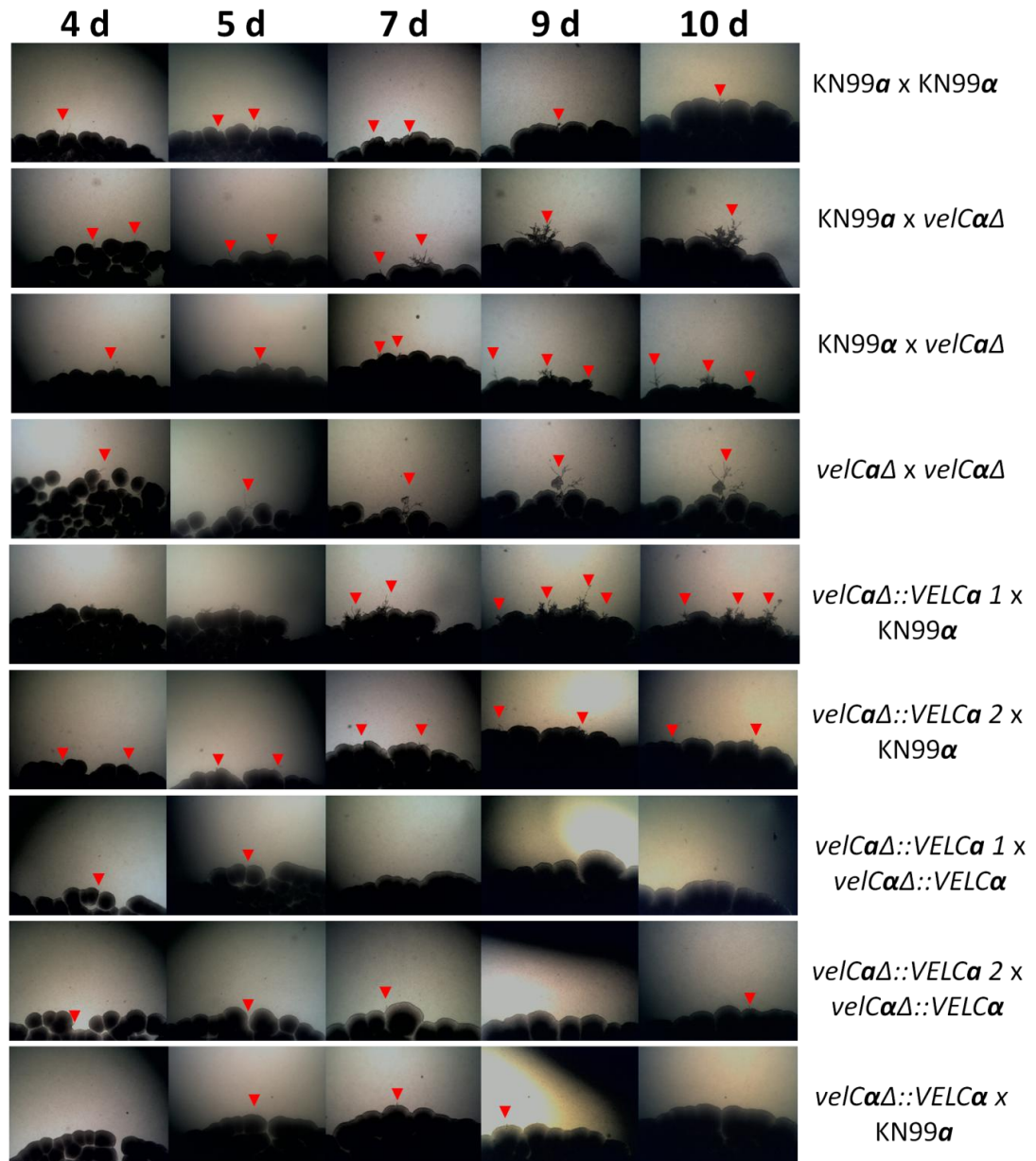
As **figuras 41- 44** apresentam os resultados obtidos com acasalamentos dos mutantes de *VELC* em diferentes meios de cultura.

**Figura 41** - Acasalamento entre as cepas selvagem, mutante e reconstituídas de *VELC* acompanhadas diariamente em meio Filament por até 10 dias na ausência de luz branca. As fotos foram tiradas em magnificação de 40x. Os triângulos vermelhos indicam o aparecimento de hifas nas bordas das colônias.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

**Figura 42** - Acasalamento entre as cepas selvagem, mutante e reconstituídas de *VELC* acompanhadas diariamente em meio MS por até 10 dias na ausência de luz branca. As fotos foram tiradas em magnificação de 40x. Os triângulos vermelhos indicam o aparecimento de hifas nas bordas das colônias.

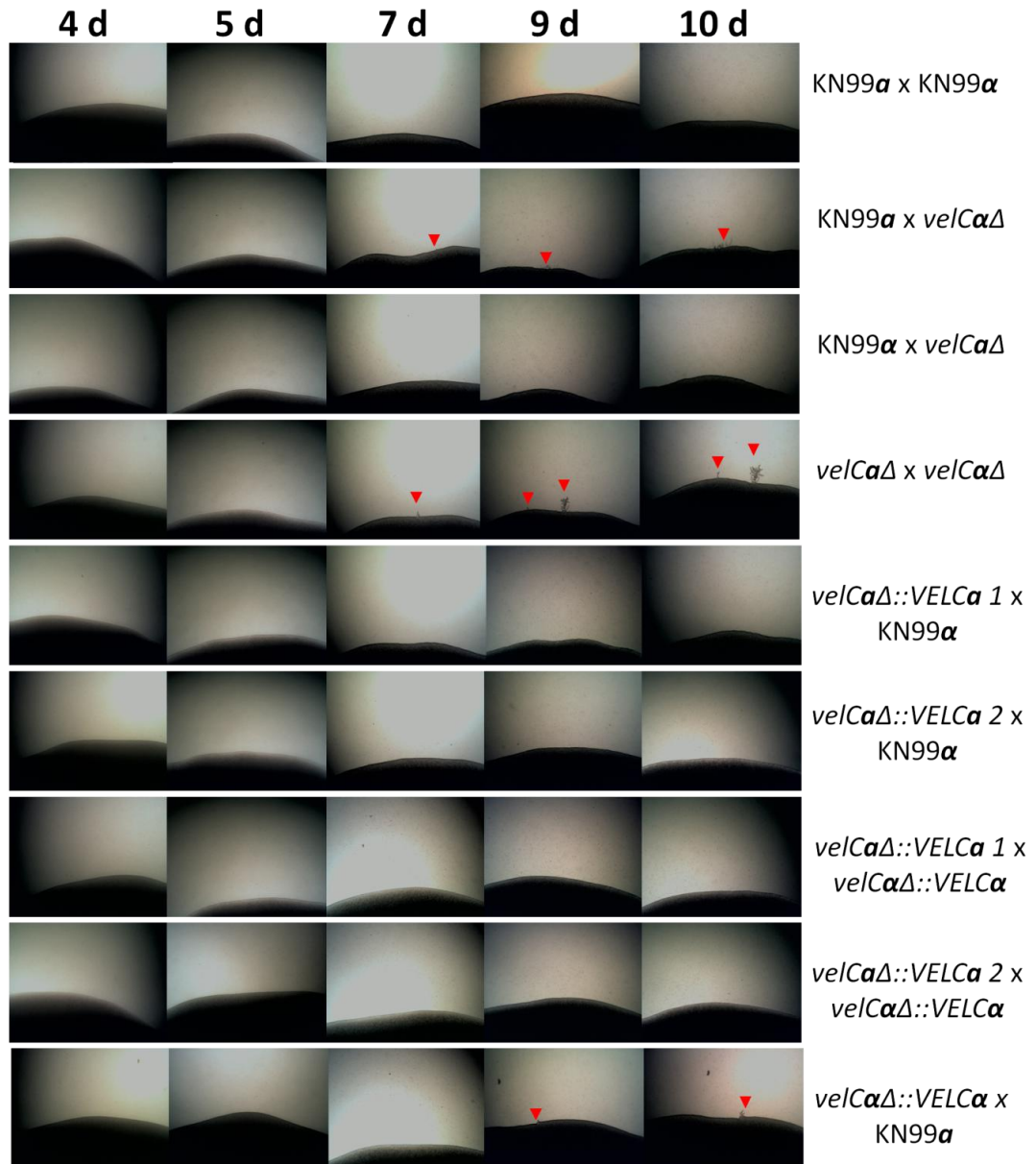


Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Foi observada uma diferença muito sutil no aumento da produção de hifas no cruzamento entre os mutantes de *VELC*, os quais se assemelham muito ao cruzamento controle (**Figura 43**) em meio MS e em meio Filament Agar (**Figura 42**).



**Figura 43** - Acasalamento entre as cepas selvagem, mutante e reconstituídas de *VELC* acompanhadas diariamente em meio SLAD por até 10 dias na ausência de luz branca. As fotos foram tiradas em magnificação de 40x. Os triângulos vermelhos indicam o aparecimento de hifas nas bordas das colônias.

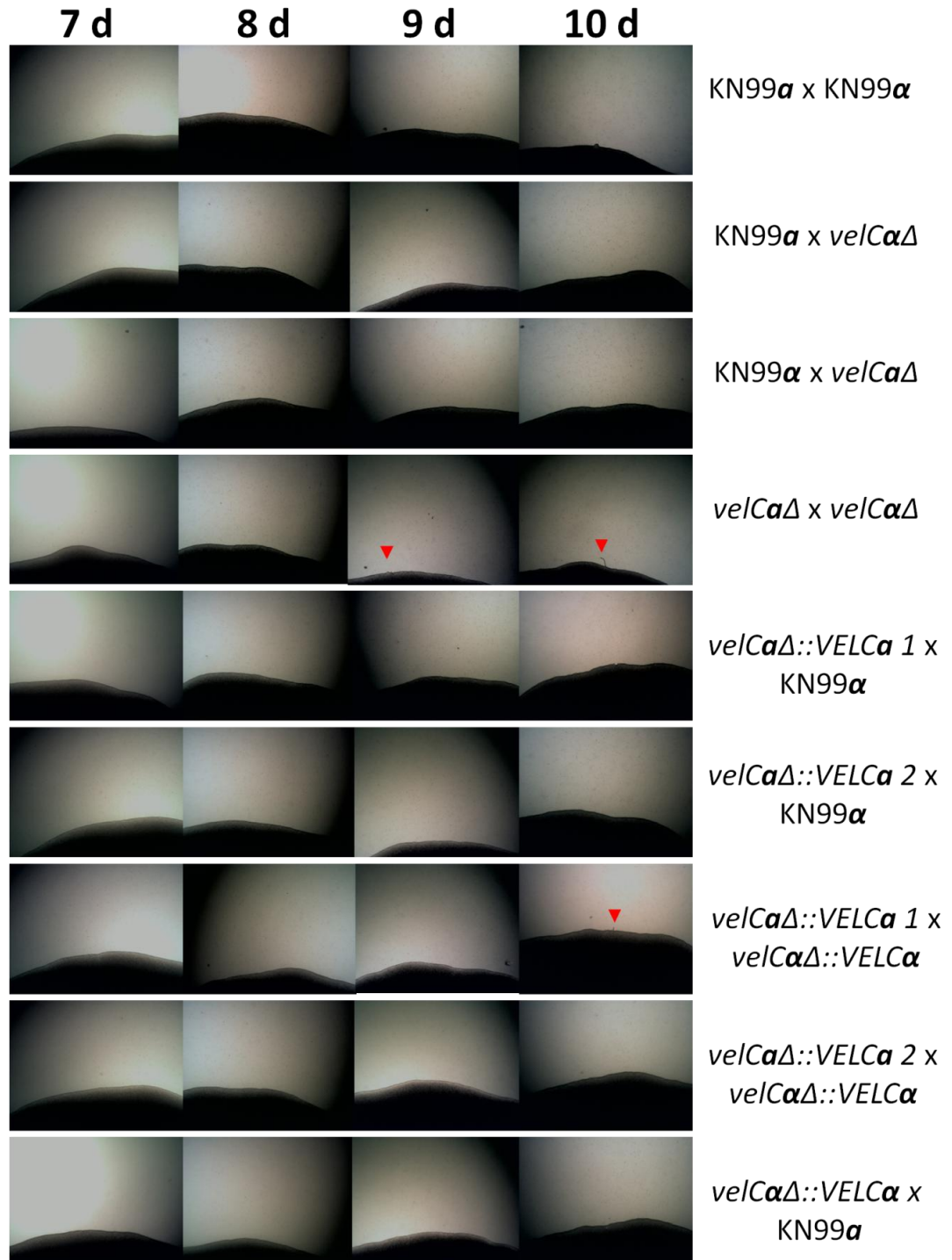


Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Assim como realizado com *VEA*, os testes de acasalamento também ocorreram em meio SLAD na ausência de luz. Foi observado que neste experimento independente não houve formação de hifas provenientes do cruzamento entre os selvagens, diferentemente do observado no experimento realizado com *VEA*. Tal mudança pode ser atribuída à umidade do período em que o teste foi realizado com *VELC*. É possível observar que o cruzamento entre mutantes apresenta hifas na periferia da colônia.

Da mesma forma, foi realizado o teste de acasalamento na presença de luz, os cruzamentos de *VELC* também foram submetidos às mesmas condições. O meio SLAD foi utilizado devido a esse fenótipo ter sido observado inicialmente no mesmo **(Figura 44)**.

**Figura 44** – Acasalamento entre as cepas selvagem, mutante e reconstituídas de *VELC* acompanhadas diariamente em meio SLAD por até 10 dias na presença de luz branca. As fotos foram tiradas em magnificação de 40x. Os triângulos vermelhos indicam o aparecimento de hifas nas bordas das colônias.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

O fenótipo observado com os mutantes de *VELC* quando expostos à luz contínua se assemelha ao fenótipo encontrado em *VEA*. Os cruzamentos bilaterais de *velCa* $\Delta$  demonstram uma insensibilidade tardia a luz branca. Também foi possível



observar que o reconstituído *velCaΔ 1* não reconstituiu o fenótipo completamente, conseguindo assim realizar a formação de hifas mesmo com a presença de luz.

Sabe-se que quando células de tipos sexuais opostos se encontram, ambas secretam feromônios que são capazes de desencadear a fusão celular, culminando na diferenciação celular e formação de hifas. Todo esse processo trata-se de um evento complexo que envolve as MAPK, cujo engatilhamento é disparado por meio de feromônios (Lengeler *et al.*, 2000). Em *C. neoformans*, os principais estímulos repressores de acasalamento são alta concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera, alta umidade e presença de luz (Lin, 2009). A fim de verificar o papel de *VEA* no desenvolvimento sexual e sensoriamento de luz, tendo em vista que *VeA* em *A. nidulans* também interage com o complexo fotorreceptor deste fungo (Purschwitz *et al.*, 2009), e que, a deleção dos fotorreceptores de luz azul, *BWC1* e *BWC2* em *C. neoformans* tem como resultado a insensibilidade do fungo à luz quando este é submetido ao acasalamento (Idnurm & Heitman, 2005; Lu *et al.*, 2005), foi realizado o ensaio de acasalamento na presença de luz.

Por meio do ensaio de acasalamento, foi possível observar que *VEA* possui o papel de regulador negativo de acasalamento em *C. neoformans*, fenótipo que difere do que se sabe sobre a função deste gene em diversos fungos filamentosos, onde *VEA* é um regulador positivo do desenvolvimento sexual e produção de metabólitos secundários (Bayram & Braus, 2012). A deleção de *VEA* em *A. nidulans* tem como principal efeito a extinção do desenvolvimento sexual dependente de luz, não formando cleistotécio mesmo em condições favoráveis (escuro) e tendo a produção de esterigmatocistina reduzida em função da deleção (Kim *et al.*, 2002). Em outros fungos filamentosos como *B. cinerea* e *H. capsulatum* a deleção de *VEA* corrobora a função deste gene em *A. nidulans*, tendo como efeito principal a ausência de estruturas sexuais (Laskowski-Peak *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013). Por outro lado, Em *P. chrysogenum*, a deleção dos *velvets* apresenta papéis opostos (Kopke *et al.*, 2013).

*VELC* de *C. neoformans* parece ter um papel mais sutil no processo de acasalamento, não extinguindo nem provocando hiperfilamentação no modelo em estudo. Pouco se sabe sobre o papel de *VELC* nos mais diversos fungos filamentosos, porém estudos vêm sendo realizados a fim de trazer à luz o papel de *VELC* na morfogênese, desenvolvimento sexual, patogenicidade e metabolismo secundário nestes fungos. Recente estudo funcional de *VELC* em *A. nidulans*

revelou que a deleção de *VELC* neste modelo provoca a extinção da produção de estruturas sexuais (Park *et al.*, 2014). Em *M. oryzae*, a deleção de *VELC* tem como principal efeito a alteração na parede celular da apressoria deste fitopatógeno, culminando na redução da virulência neste modelo (Kim *et al.*, 2014).

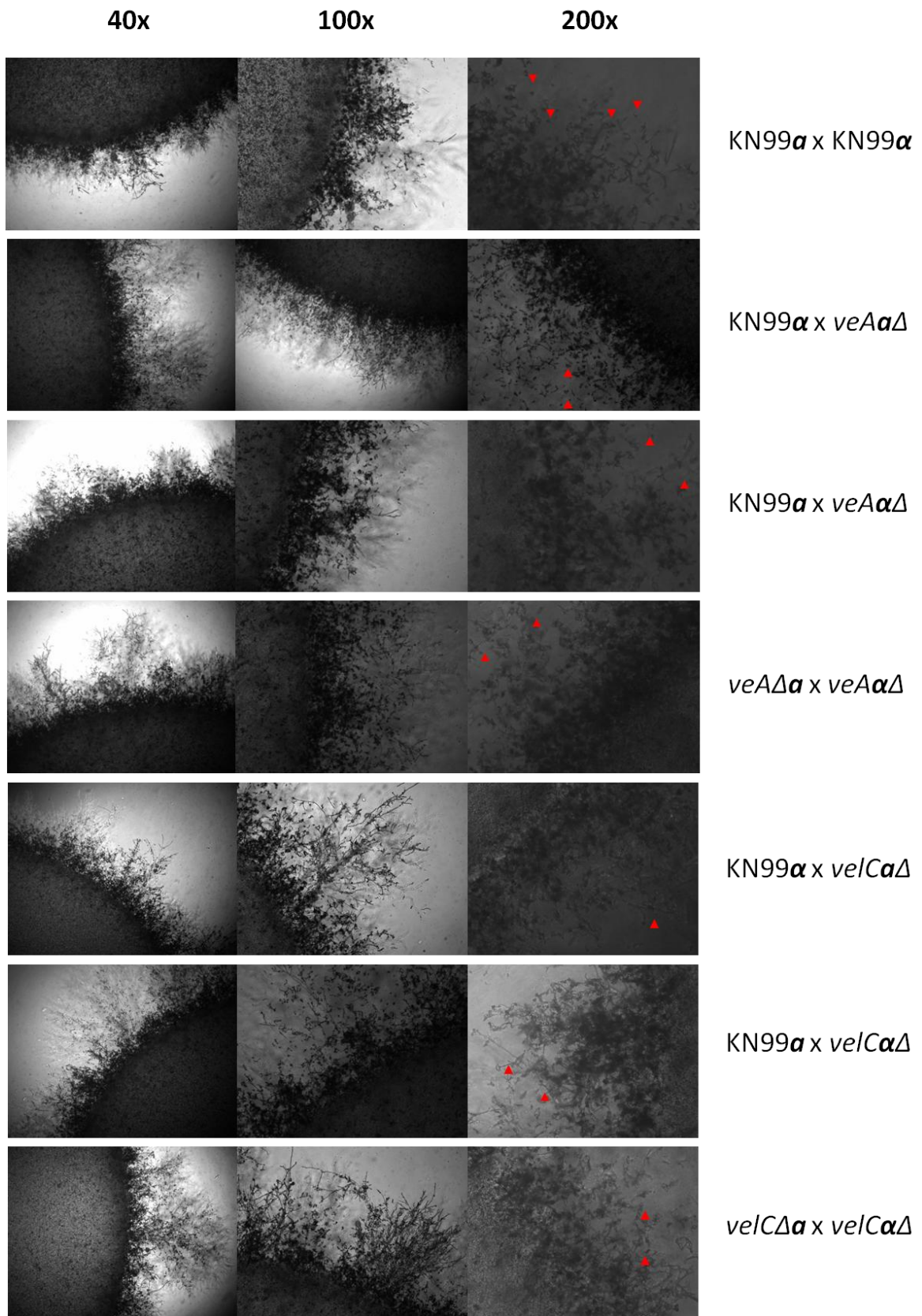
Também foi observado que em *C. neoformans*, *VELC* parece estar relacionado ao sensoriamento de luz, bem como *VEA*, no qual o acasalamento bilateral de *velCaΔ* e *velCaΔ* apresenta início de filamentação a partir do nono dia de co-cultivo em meio SLAD na presença de luz branca.

Até o momento, já foi identificada a interação de *VEA* com o complexo fotorreceptor de *A. nidulans* (Blumenstein *et al.*, 2005 ; Purschwitz *et al.*, 2009), porém ainda não se sabe as interações de *VelC* com outras proteínas que não sejam as *velvet*.

#### 4.5 Análise microscópica das hifas dos cruzamentos de selvagens e mutantes de *VEA* e *VELC*

A fim de verificar a presença de anomalias na estrutura das hifas dos mutantes e presença das cadeias de basidiósporos, a análise microscópica dos cruzamentos foi realizada (**Figuras 45 e 46**).

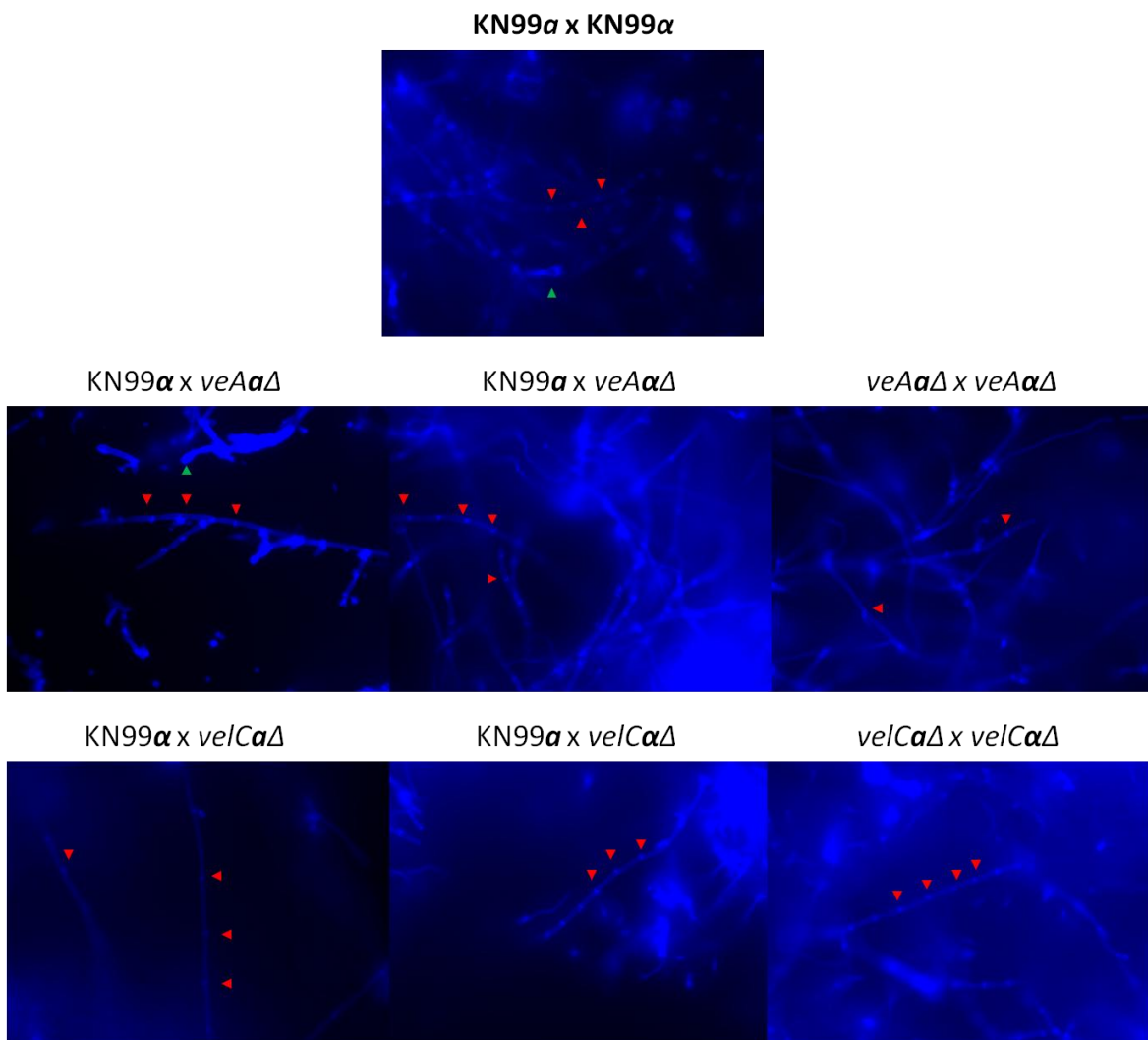
**Figura 45** - Microscopia em DIC da periferia dos cruzamentos de selvagens e mutantes de *VEA* e *VELC*. Os triângulos vermelhos indicam a presença de basídios contendo cadeias de basidiósporos.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Por meio da microscopia nas magnificação 200 vezes, foi possível observar que a deleção de *VEA* ou *VELC* não prejudica a formação das cadeias de basidiósporos, indicadas pelos triângulos vermelhos. Em *A. nidulans*, a deleção de *VEA* ou *VELC* extingue a produção de estruturas sexuais e promove o aumento da conidiação (Kim *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2014).

**Figura 46** - Análise da morfologia das hifas por microscopia de fluorescência. As hifas foram coradas com Calcofluor *White* a fim de verificar alterações na morfologia das hifas dos cruzamentos bilaterais e unilaterais de *VEA* e *VELC* em relação ao cruzamento controle (KN99 $\alpha$  x KN99 $\alpha$ ). As setas vermelhas indicam a presença de septos e das conexões em forma de grampo. As setas verdes indicam os basídios.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

A partir das imagens obtidas na microscopia de fluorescência, pode-se observar que não houve qualquer alteração morfológica nas hifas entre os

cruzamentos unilaterais e bilaterais de *VEA* e *VELC* em relação ao cruzamento entre os selvagens. Pode-se afirmar então, que a deleção de *VEA* ou *VELC* em *C. neoformans* não altera a morfologia das hifas.

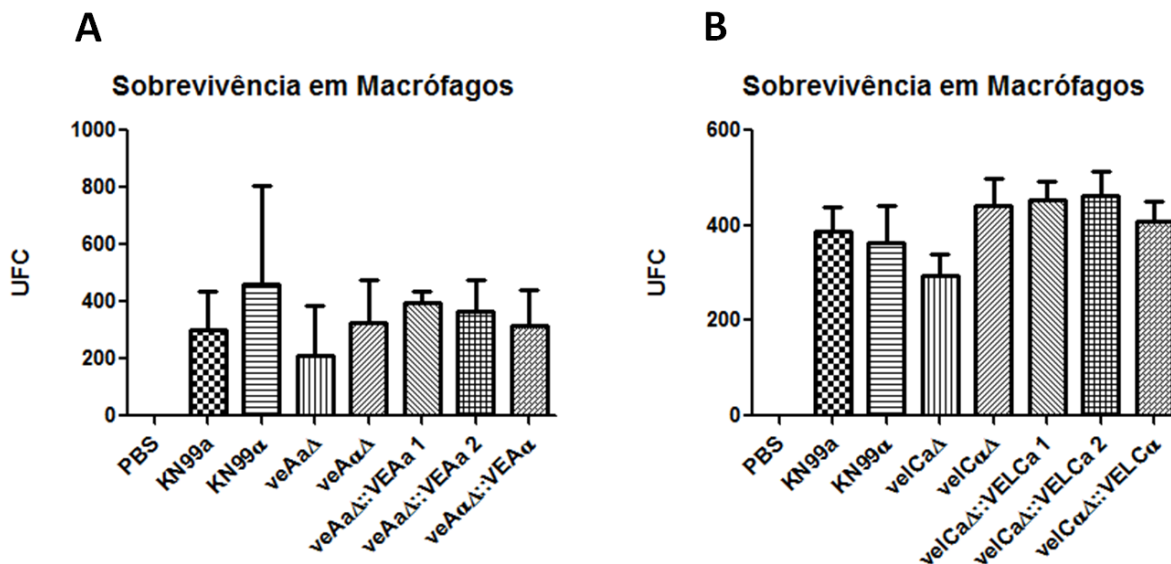
A deleção de *VEA* em outros fungos pode acarretar na alteração da morfologia das hifas como observado em *N. crassa* e *P. chrysogenum* (Bayram *et al.*, 2008a; Hoff *et al.*, 2009) em que a deleção de *VEA* provoca encurtamento das hifas, porém nenhuma alteração foi observada no modelo utilizado quando submetido ao acasalamento.

*VELC* por sua vez, em *A. nidulans*, participa do desenvolvimento sexual do fungo. Este, quando deletado, não consegue produzir estruturas sexuais (Park *et al.*, 2014). Também foi observado que a deleção de *VELC* provoca redução do tamanho dos conídios em *F. oxysporum* (López-Berges, 2013).

#### 4.6 Sobrevivência *in vitro* dos mutantes *veAΔ* e *velCΔ*

As cepas selvagem, mutante e reconstituída foram avaliadas quanto a sua capacidade de sobrevivência por meio de ensaio de fagocitose em macrófagos (**Figura 47**). Sabe-se que mutantes de *VEA* em *H. capsulatum* e outros fungos fitopatogênicos como *F. graminearum*, *F. oxysporum* e *M. oryzae* (Jiang *et al.*, 2011; Merhej *et al.*, 2012; López-Berges *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014) tem sua virulência atenuada. Quanto à *VELC*, há somente um relato da participação deste gene na patogenicidade no fitopatógeno *M. oryzae* (Kim *et al.*, 2014). Logo, foram investigados os papéis de *VEA* e *VELC* na patogenicidade de *C. neoformans* por meio de ensaio de sobrevivência *in vitro* após a fagocitose por macrófagos.

**Figura 47** – Ensaio de sobrevivência em macrófagos peritoneais murinos J774. A1. Sobrevivência das cepas selvagens, mutantes e reconstituída de *VEA* e *VELC* de *C. neoformans* após a fagocitose. Os experimentos são representativos de duplicatas experimentais e cada experimento independente foi realizado em triplicata biológica.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

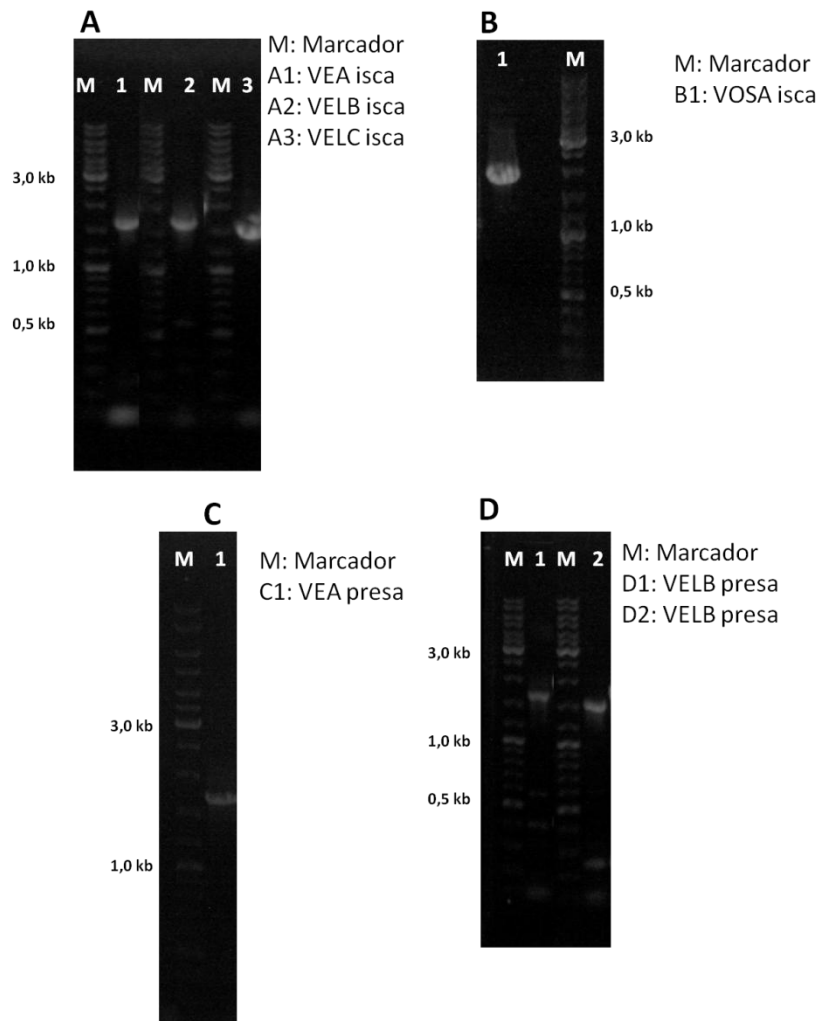
A partir da análise dos resultados do teste de sobrevivência foi possível afirmar que não há diferença significativa entre as taxas de sobrevivência das cepas avaliadas ( $p > 0.05$ ) de acordo com teste estatístico *Oneway ANOVA* seguido de teste de Tukey. A ausência de *VEA* ou *VELC* não prejudica a sobrevivência de *C. neoformans* após a fagocitose por macrófagos.

Sabe-se que a deleção de *VEA* em *H. capsulatum* interfere na virulência deste patógeno, não causando doença em modelo animal (Laskowski-Peak, *et al.*, 2012). Em outros fungos fitopatógenos, tais como *F. graminearum* e *F. oxysporum* (Jianj *et al.*, 2011; Merhej *et al.*, 2012; López-Berges *et al.*, 2013), a deleção de *VEA* também provoca a redução da virulência em. Em contrapartida, *VELC* de *F. oxysporum* se comporta de forma semelhante ao selvagem quando realizado teste de virulência em plantas (López-Berges *et al.*, 2013), diferindo dos mutantes de *VELC* em *M. oryzae*, tem sua virulência atenuada quando submetida a teste de virulência em folhas de arroz, apresentando poucos focos de lesões nas mesmas (Kim *et al.*, 2014).

#### 4.7 Análise da interação dos velvets de *C. neoformans*– Duplo-Híbrido

As interações e formação de complexos entre os *velvets* são amplamente estudadas no modelo *A. nidulans* (Bayram & Braus, 2008b). A fim de verificar a interação dos *velvets* de *C. neoformans*, foram construídas cepas das iscas e presas dos *velvets* fusionadas ao domínio de ativação (AD) ou domínio de ligação (BD) de *GAL4*. Para que isso fosse possível, foram realizadas reações de amplificação a fim de isolar cada um dos genes *velvets* de *C. neoformans* para posterior clonagem no plasmídeo da isca (pGBKT7) e da presa (pGADT7) (**Figura 48**).

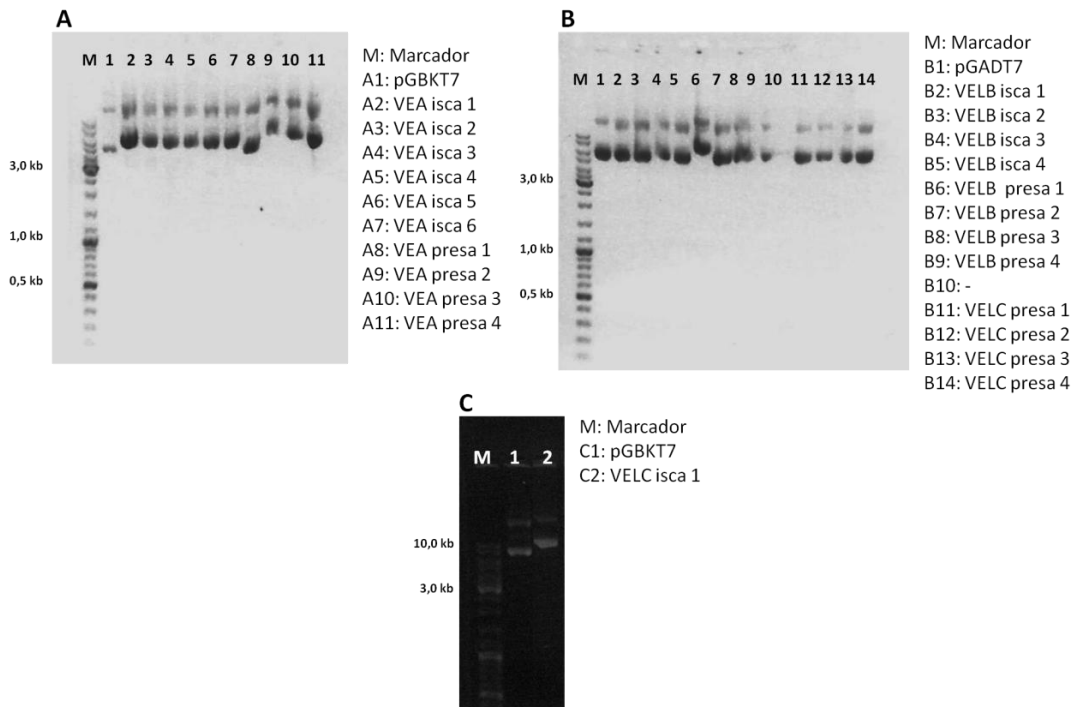
**Figura 48** - Amplificação dos cDNAs dos *velvets* de *C. neoformans*. **(A)** Amplificação dos cDNAs das iscas de *VEA*, *VELB* e *VELC*. **(B)** Amplificação do cDNA da isca de *VOSA*. **(C)** Amplificação do cDNA da presa de *VEA*. **(D)** Amplificação dos cDNAs das presas de *VELB* e *VELC*. Os tamanhos esperados foram 1,6 Kb para *VEA*; 1,7 Kb por *VELB*; 1,5 Kb para *VELC* e 1,9 Kb para *VOSA*.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Após a amplificação do cDNA de cada um dos *velvets* de *C. neoformans*, os mesmos foram clonados em seus respectivos plasmídeos com o auxílio do sistema de recombinação *In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kit* (Clontech), transformados em *E. coli* e posteriormente extraídos com o auxílio do kit *Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare) para que os mesmos pudessem ser transformados em leveduras de Y2HGold (isca) e Y187 (presa). Os plasmídeos recuperados foram primeiramente submetidos à eletroforese em gel de agarose (**Figura 49**) e posteriormente foi realizada a amplificação dos insertos tendo os plasmídeos como amostra utilizando os oligonucleotídeos que foram utilizados para o isolamento dos cDNA's dos *velvets* (**Figura 50**). Tal amplificação foi realizada a fim de confirmar a clonagem dos insertos nos plasmídeos.

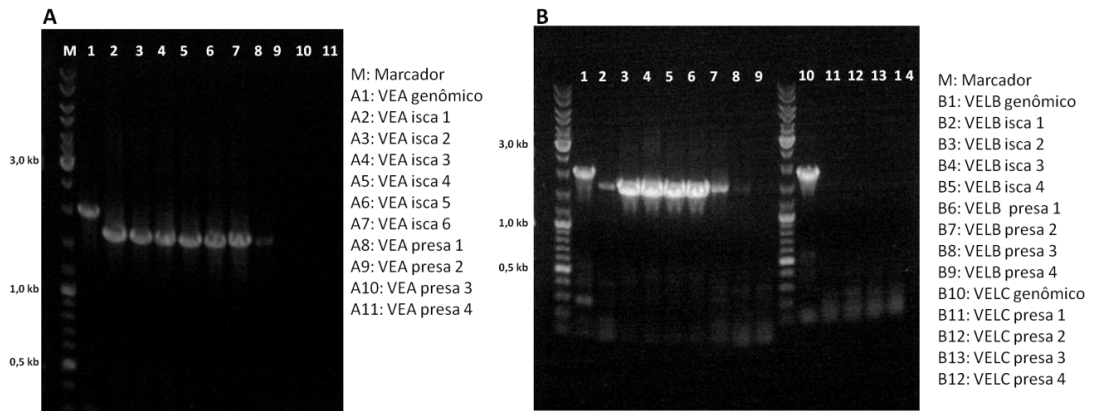
**Figura 49** – Plasmídeos obtidos após a transformação e miniprep. **(A)** Plasmídeos pGBKT7 e pGADT7 clonados os insertos de *VEA* de *C. neoformans*. **(B)** Plasmídeos pGBKT7 e pGADT7 clonados os insertos de *VELB* e pGADT7 clonado com *VELC* de *C. neoformans*. **(C)** Plasmídeo pGBKT7 clonado com *VELC* de *C. neoformans*.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.



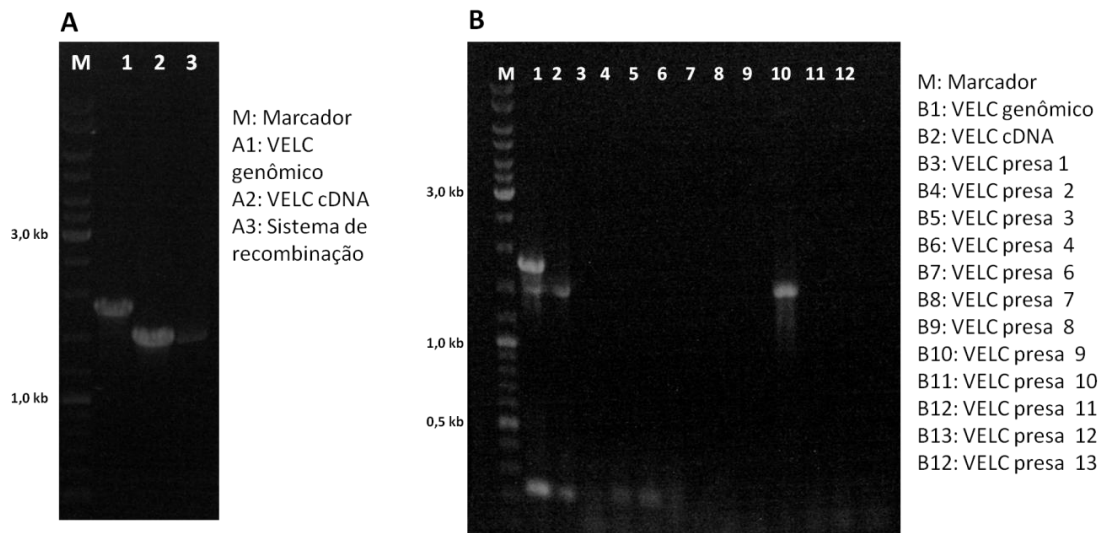
**Figura 50** - PCR de confirmação da clonagem dos insertos em seus respectivos plasmídeos. **(A)** PCR dos insertos (iscas e presas) de *VEA*. **(B)** PCR dos insertos (iscas e presas) de *VELB* e presas de *VELC*.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Como não houve amplificação nos plasmídeos escolhidos das presas de *VELC* (**Figura 50b**, poços 11-14), foi realizada uma PCR do sistema de recombinação e PCR das colônias de *E. coli* que foram escolhidas aleatoriamente. Para tal, foram utilizados os mesmos oligonucleotídeos do isolamento do cDNA de *VELC* (**Figura 51**).

**Figura 51** - PCR do sistema de recombinação de *VELC* e PCR de colônia. **(A)** PCR do sistema de colônia da presa de *VELC*. **(B)** PCR de colônias transformadas com o sistema de recombinação da presa de *VELC*.

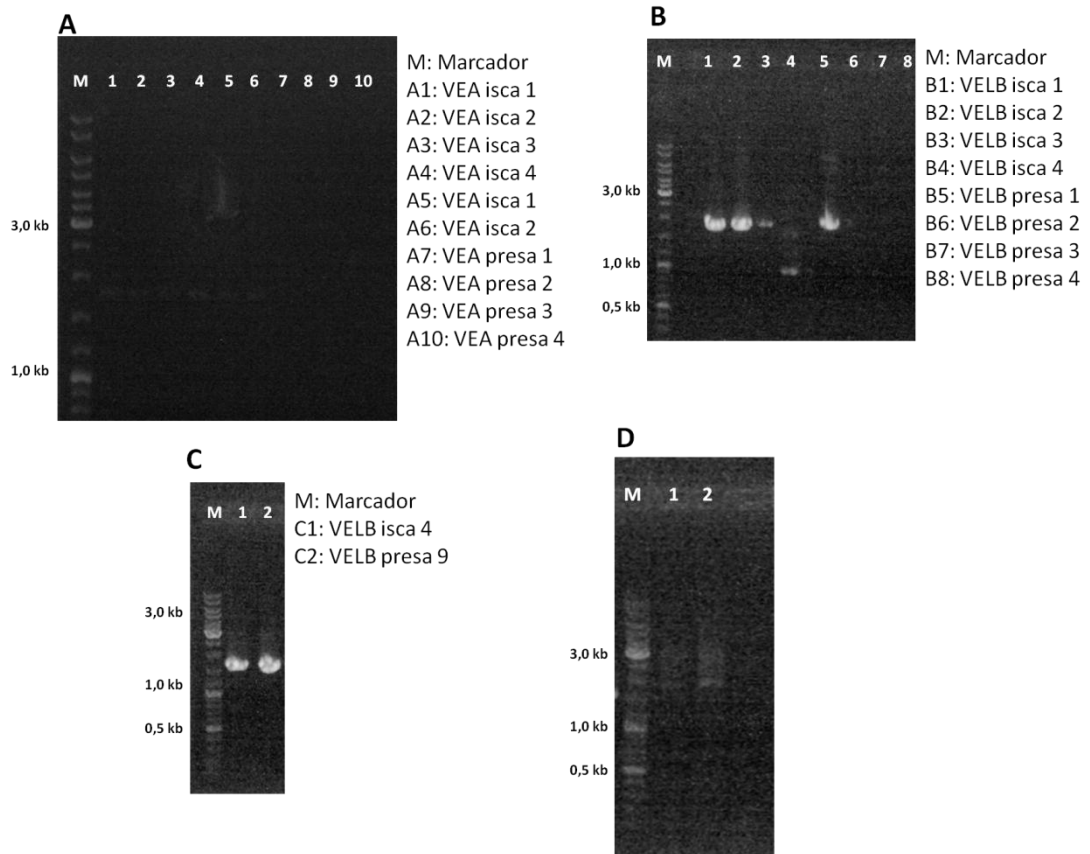


Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Foi obtida somente uma colônia transformante (**Figura 51b**). Em seguida, foi realizada uma segunda confirmação de clonagem por amplificação usando o

oligonucleotídeo T7 combinado com o oligonucleotídeo reverso (utilizado para a amplificação do cDNA) do gene *velvet* em questão (**Figura 52**).

**Figura 52** - Confirmação da clonagem por meio de PCR com oligonucleotídeo T7. **(A)** Amplificação dos insertos de *VEA* presa e isca. **(B)** Amplificação dos insertos de *VELB* isca e presa. **(C)** Amplificação dos insertos de *VELC* isca e presa. **(D)** Amplificação dos insertos da isca de *VOSA*. Os tamanhos esperados foram de aproximadamente 1,7 Kb para *VEA*, 1,8 Kb para *VELB*, 1,6 Kb para *VELC* e 2 Kb para *VOSA*.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Após a transformação das leveduras com os plasmídeos, as leveduras transformantes foram testadas quanto à toxicidade e autoativação. A toxicidade foi verificada ao comparar o tamanho das colônias transformadas com o plasmídeo + inserto em relação às colônias transformadas com o plasmídeo vazio. A autoativação foi verificada por meio do plaqueamento das colônias em meio com X- $\alpha$ -Gal e Aureobasidina A, e meio contendo somente X- $\alpha$ -Gal, nos quais as colônias não deviam crescer na placa com Aureobasidina A e X- $\alpha$ -Gal e não deviam se tornar azuis na placa contendo somente X- $\alpha$ -Gal.

Até o momento, os experimentos de duplo-híbrido estão sendo padronizados pelo nosso grupo, estando estes em curso utilizando diferentes metodologias de

cultivo e plaqueamento a fim de obtermos resultados confiáveis, sem viés de falso-positivo ou falso-negativo em função de autoativação ou problemas com o crescimento das cepas. Após a padronização das interações diretas (presa e iscas conhecidas), também será colocado em andamento o ensaio de interação das iscas dos *velvets* com a biblioteca presas contendo o cDNA de *C. neoformans* em *S. cerevisiae*, a fim de esclarecer quais são as principais proteínas que interagem com o complexo *velvet* de *C. neoformans*.

## 5 DISCUSSÃO

O patógeno *C. neoformans* tem chamado a atenção de maneira mundial devido à alta incidência de morte entre os pacientes portadores do HIV em decorrência de complicações associadas a micoses sistêmicas, em especial, a criptococose (Park *et al.*, 2009), compreender a biologia deste patógeno é de grande importância para intervir na emergência da doença. As espécies causadoras da criptococose, *C. neoformans* e *C. gattii*, tem como principais fatores de virulência o crescimento a 37°C, a produção de cápsula polissacarídica, produção de melanina, secreção de fosfolipases e urease (Idnurm *et al.*, 2005), fatores estes que são cruciais para o início da doença e desenvolvimento da mesma. O *C. neoformans* geralmente é encontrado como levedura haploide, porém pode sofrer filamentação quando este encontra um parceiro sexual oposto quando em condição de privação de nitrogênio (Lin, 2009).

As proteínas *velvet* têm sido caracterizadas em fungos filamentosos como reguladores do desenvolvimento fúngico e metabolismo secundário (Bayram & Braus, 2012), metabólitos estes que afetam direta ou indiretamente a saúde humana, tendo em vista que micotoxinas como a aflatoxina são carcinogênicas; e a produção de antibióticos como penicilina. *VEA* tem como principal papel a regulação da produção de metabólitos secundários, quando este gene é deletado em *A. nidulans*, *A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. chrysogenum* e *P. chrysogenum* ocorre uma redução drástica destes metabólitos, bem como também pode ocorrer alterações no desenvolvimento fúngico decorrente da deleção de *VEA* (Kim *et al.*, 2002; Calvo *et al.*, 2004; Dreyer *et al.*, 2007; Durán *et al.*, 2007; Hoff *et al.*, 2010; Kopke *et al.*, 2013). *VEA* também participa da virulência de vários fitopatógenos tais como *F. graminearum*, *F. oxysporum* e *M. oryzae* (Jiang *et al.*, 2011; Merhej *et al.*, 2012; López-Berges *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014) e também da virulência de *H. capsulatum*, agente etiológico da histoplasose (Laskowski-Peak *et al.*, 2012). Os mais diversos fenótipos têm sido atribuídos à *VEA*, como listado na **Tabela 1** deste estudo.

*VELC* por sua vez, foi o último *velvet* a ser descoberto (Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010; Bayram & Braus, 2012) e foi recentemente caracterizado em *A. nidulans*, possuindo um papel de regulador positivo do desenvolvimento sexual fúngico (Park *et al.*, 2014), porém também está envolvido na morfologia dos conídios de *F. oxysporum*, que apresentam tamanho reduzido quando este gene é deletado

(López-Berges *et al.*, 2013) e estando envolvido também na morfologia e patogenicidade de *M. oryzae* (Kim *et al.*, 2014).

Em adição, as interações entre os *velvet* têm sido amplamente estudadas em diversos organismos (Bayram *et al.*, 2008b; Park *et al.*, 2012; Kopke *et al.*, 2013) e tem demonstrado que estas interações são conservadas. Também se sabe que o complexo fotorreceptor de *A. nidulans* interage diretamente com *VEA* (Purschwitz *et al.*, 2009).

No presente estudo, foi identificada a presença os genes *velvet VEA* e *VELC* no patógeno *C. neoformans* e os mesmos foram caracterizados por meio de deleção e análise fenotípica. A análise *in silico* revelou que *VeA* e *VelC* possuem um ancestral comum e que diferentemente de *VeA* e *VelC* de *A. nidulans*, estas proteínas de *C. neoformans* diferem de *VeA* e *VelC* de *A. nidulans* (Bayram & Braus, 2012).

Apesar de ter ocorrido atualização no banco de dados e ser observado que na nova sequência há um domínio PEST na região C-terminal, a deleção do domínio *velvet* (que se localiza na região N-terminal) foi realizada, no qual se pode atribuir os fenótipos observados devido à ausência do domínio *velvet* neste fungo.

Foi verificada que não houve alteração nos principais fatores de virulência deste fungo, bem como na capacidade de sobrevivência do fungo a fagocitose por macrófagos murinos e na morfologia de hifas, septos, conexões grampo bem como na formação das cadeias de basidiósporos. O principal papel desempenhado por estes genes são no desenvolvimento sexual e sensoriamento de luz, onde *VEA* tem como papel regular negativamente (repressor) o acasalamento, onde o cruzamento bilateral (entre *veAΔ*) apresenta hifas nas bordas da colônia antes mesmo do cruzamento bilateral selvagem, sendo que uma cópia do gene é suficiente para retardar a aparição de hifas. O processo de acasalamento de *C. neoformans* se torna 'cego' quando realizado o acasalamento na presença de luz branca, conseguindo assim, realizar este processo nesta condição repressora (Idnurm & Heitman, 2005; Lu *et al.*, 2005; Bahn *et al.*, 2007; Lin, 2009).

A deleção de *VELC* não afeta o desenvolvimento sexual, não apresentando fenótipo de hiperfilamentação ou extinção de acasalamento como ocorre quando *VOSA* ou *VELB* estão ausentes neste mesmo fungo (Peconick, 2013; Barros, 2014), bem como não altera os principais fatores de virulência do modelo escolhido. Outro fenótipo observado neste estudo foi a 'cegueira' tardia do cruzamento bilateral entre

os mutantes de *VELC* quando submetidos ao acasalamento na presença de luz branca.

Estudos realizados com mutantes das proteínas *White collar* de *C. neoformans* revelam que quando deletadas, o fungo não consegue perceber a presença de luz (Idnurm & Heitman, 2005; Lu *et al.*, 2005). Também já foi reportado que *VeA* de *A. nidulans* interage com o complexo fotorreceptor deste modelo, que se trata de um complexo de proteínas *White collar* (Blumenstein *et al.*, 2005; Purschwitz *et al.*, 2008; Purschwitz *et al.*, 2009), Sabendo destes dados, pode-se inferir que a ‘cegueira’ existente nos mutantes de *VEA* deste estudo são devido a ausência de interação com o complexo fotorreceptor constituído das proteínas *Bwc1* e *Bwc2*, também é provável que *VelC* tenha papel na interação com este complexo, já que este apresenta insensibilidade tardia a luz branca.

A fim de verificar as interações entre os *velvets* de *C. neoformans*, nosso grupo iniciou a obtenção de cepas ‘iscas’ e ‘presas’ de *VEA*, *VELB*, *VELC* e *VOSA*. Até o presente momento, confirmamos as clonagens e realizamos a transformação das cepas de *S. cerevisiae*, porém temos buscado a padronização do acasalamento para evitar a presença de interações falso-positivas e falso-negativas. Após a padronização da técnica, será realizado o acasalamento com a biblioteca de cDNA de *C. neoformans* em *S. cerevisiae* a fim de identificar os interactantes de *VeA*, *VelB*, *VelC* e *VosA* de *C. neoformans*.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstra que *VEA* e *VELC* de *C. neoformans*, um basidiomiceto, não participam da regulação dos fatores de virulência deste fungo e não tem sua sensibilidade alterada nas condições de estresse testadas. Os mutantes destes genes conseguem sobreviver após a fagocitose por macrófagos, bem como não apresentam alterações na morfologia das hifas quando submetidos ao acasalamento. Até o momento só foram descritos *VosA* e *VeIB* em outro basidiomiceto, *Ustilago maydis* (Karakkat *et al.*, 2013), que pela análise do nosso grupo *umv1*, *umv2* e *umv3* correspondem a *VOSA*, *VELB* e *VEA*, respectivamente. O nosso grupo recentemente identificou e caracterizou os genes *VOSA* e *VELB* em *C. neoformans*, a deleção destes genes no modelo em questão extingue os eventos de fusão celular (para ambos os genes), participam na regulação positiva do acasalamento (ambos os genes) e, no caso de *VOSA*, a deleção deste gene altera a morfologia das hifas no cruzamento unilateral (Peconick, 2013; Barros, 2014).

O presente trabalho demonstra, de forma inédita, que *VEA* e *VELC*, neste modelo, participam na regulação do processo de acasalamento, também sendo insensíveis à luz que, em *C. neoformans*, reprime o acasalamento.

Nos cruzamentos bilaterais dos mutantes de *VEA*, o acasalamento ocorre com dois dias de co-cultivo em condições ideais, enquanto o selvagem apresenta o começo de produção de hifas a partir do quarto dia nos meios Filament e MS. Também foi possível observar que uma cópia do gene selvagem é capaz de diminuir a formação de hifas (cruzamentos unilaterais), em vista que nos cruzamentos bilaterais de *veAΔ*, podem ser observados múltiplas formações de hifas. Em meio SLAD, o aparecimento de hifas no cruzamento entre mutantes ocorre a partir do terceiro dia (escuro), enquanto os selvagens apresentam início de acasalamento no nono dia. No mesmo meio, porém na presença constante de luz branca, foi observado que no cruzamento entre *veAΔ*, este é insensível à luz, apresentando hifas a partir do sexto dia de incubação, porém uma cópia de *VEA* é suficiente para reprimir este fenômeno.

Da mesma forma, os *veICΔ* foram submetidos às mesmas condições que *veAΔ*. O principal fenótipo encontrado nestes mutantes foi a insensibilidade tardia a luz branca quando submetido ao acasalamento, apresentando filamentos a partir do nono dia em meio SLAD na presença de luz, fenótipo que é reprimido quando observado o cruzamento unilateral. Quanto ao acasalamento em condições

favoráveis, os mutantes de *VELC* iniciam a produção de hifas no sétimo dia em meio Filament e SLAD e no quarto dia em meio MS.

Também não houve diferença no crescimento da cepa selvagem, dos mutantes e reconstituídos em meios com diferentes quantidades de nitrogênio. Indicando assim, que não há alteração no sensoriamento de nitrogênio nos mutantes obtidos neste estudo.



## 7 PERSPECTIVAS

Tendo em vista que o processo de acasalamento se trata de uma cadeia de eventos complexos, ainda são necessários mais estudos para melhor compreender os genes que regulam esse processo. O presente estudo revela que os genes *velvet* *VEA* e *VELC* estão envolvidos desenvolvimento sexual de *C. neoformans*, porém os eventos que os mesmos regulam e quais genes estão envolvidos, ainda devem ser esclarecidos. Os resultados obtidos com a deleção de *VEA* apresentaram um fenótipo inesperado ao que se encontra na literatura, onde *VEA* em fungos filamentosos está envolvido na regulação positiva do desenvolvimento sexual e regula negativamente o desenvolvimento assexuado, bem como também está relacionado à produção das micotoxinas em diversos fungos (Bayram & Braus, 2012) e também pode apresentar defeitos no estabelecimento da doença em fitopatógenos (Jiang *et al.*, 2011; Merhej *et al.*, 2012; López-Berges *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). Em *C. neoformans*, a ausência de *VEA* não afeta os principais fatores de virulência deste fungo, bem como não reduz a sobrevivência dos mutantes após a fagocitose por macrófagos peritonias murinos J774.A1, o que indica que, possivelmente, este gene não está envolvido nas vias relacionadas a tais fatores, porém as cepas *veAΔ* se demonstram envolvidas na regulação negativa no acasalamento e apresentaram participação no sensoriamento de luz branca neste patógeno, no qual foi observada a capacidade de produção de hifas resultantes de acasalamento mesmo na presença da condição repressora testada.

O gene *VELC* por sua vez, ainda tem sido estudado em fungos filamentosos, estudos em *A. nidulans* sugerem que *VELC* esteja envolvido no desenvolvimento sexuado, como um regulador positivo, já que sua deleção provoca uma diminuição drástica na produção de estruturas sexuais assemelhando-se com o fenótipo observado no mutante de *VOSA* no mesmo organismo (Park *et al.*, 2014). Em *F. oxysporum*, a deleção de *VELC* provoca fenótipos sutis, bem como também o faz em *A. fumigatus* (Park *et al.*, 2012; López-Berges *et al.*, 2013). Em *C. neoformans*, a deleção de *VELC*, assim como *VEA*, *VELB*, e *VOSA* não afeta os principais fatores de virulência do fungo e não afeta a sobrevivência do mutante após a fagocitose (Peconick, 2013; Barros, 2014). O cruzamento bilateral não apresenta defeito na septação, morfologia das hifas e produção das cadeias de basidiósporos, fenômeno observado também nos mutantes de *VEA*. Também foi observado que a deleção de *VELC* provoca, assim como em *veAΔ*, a insensibilidade a luz branca, porém de

modo tardio, sendo somente observada a produção de hifas nesta condição a partir do nono dia de co-cultivo.

Também foi testada a capacidade do fungo de realizar a frutificação haploide (dados não mostrados), porém o nosso grupo não conseguiu realizar este teste com *C. neoformans* var. *grubii*, fato este que também já fora reportado em outros estudos (Xue *et al.*, 2007), sendo necessária a observação deste fenômeno no *background* *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D).

Experimentos de recombinação são necessários para verificar a fertilidade dos basidiósporos resultantes dos cruzamentos entre os mutantes. Em adição, a repetição do teste de fusão com um controle positivo válido (cepas KN99 $\alpha$  e KN99 $\alpha$  transformadas com os genes que conferem resistência à nourseotricina e à higromicina B, respectivamente) são necessários a fim de verificar se o índice de fusão celular destes mutantes está aumentado.

Apesar haver o teste de confrontação que analisa a capacidade do fungo de responder aos feromônios secretados pelo tipo sexual oposto culminando na formação de tubos de conjugação, este teste não foi realizado, podendo ser realizado em momento oportuno (Xue *et al.*, 2008).

A análise de PCR em tempo real de genes envolvidos na produção de feromônios e, principalmente, sensoriamento de luz também é necessária a fim de verificar se o fenômeno de hiperfilamentação de *veA $\Delta$*  está relacionado com estas vias, além disto, este experimento também pode ser conduzido em *velC $\Delta$*  a fim de esclarecer melhor o papel deste gene em *C. neoformans*.

O experimento de interação entre as proteínas *velvet* de *C. neoformans* atualmente encontra-se em andamento. Além deste experimento, que pode esclarecer as principais interações entre estas proteínas, o duplo-híbrido com a biblioteca de cDNA de *C. neoformans* em *S. cerevisiae*, construída pelo doutorando Hugo Costa Paes, pode trazer à luz outras proteínas que interagem com os objetos deste estudo. Outra ferramenta que pode auxiliar na compreensão do funcionamento dos *velvets* em *C. neoformans* é verificar a localização celular dos mesmos, haja vista que *VEA* e *VELC* parecem ter papel diferente e, no caso de *VeA*, não apresentam alguns domínios encontrados em *A. nidulans*, podendo talvez possuir localização celular diferente de *A. nidulans*.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed YL, Gerke J, Park H-S, Bayram Ö, Neumann P, Ni M, *et al* The velvet family of fungal regulators contains a DNA-binding domain structurally similar to NF- $\kappa$ B. *PLoS Biol.* 2013;11(12):e1001750.
- Alspaugh J A., Perfect JR, Heitman J. *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and cAMP. *Genes Dev.* 1997;11(23):3206–17.
- Alspaugh JA, Pukkila-Worley R, Harashima T, Cavallo LM, Funnell D, Cox GM, Perfect JR, Kronstad JW, Heitman J. Adenylyl cyclase Functions Downstream of the Galpha protein Gpa1 and Controls Mating and Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 2002; 1:75-84.
- Amaike S, Keller NP. Distinct Roles for VeA and LaeA in Development and Pathogenesis of *Aspergillus flavus*. *Eukaryot Cell.* 2009;8(7):1051–60.
- Amare MG, Keller NP. Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genet Biol.* Elsevier Inc.; 2014;13(4):1087–845.
- Araújo-Bazán L, Dhingra S, Chu J, Fernández-Martínez J, Calvo AM, Espeso E A. Importin alpha is an essential nuclear import carrier adaptor required for proper sexual and asexual development and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* Elsevier Inc.; 2009;46(6-7):506–15.
- Bahn Y-S, Xue C, Idnurm A, Rutherford JC, Heitman J, Cardenas ME. Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5:57–69.
- Barros, ALN. Análise funcional do gene *VELB* em *Cryptococcus neoformans* [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2014.
- Bayram O, Braus GH, Fischer R, Rodriguez-Romero J. Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genet Biol.* 2010;47(11):900–8.
- Bayram Ö, Krappmann S, Seiler S, Vogt N, Braus GH. *Neurospora crassa* ve-1 affects asexual conidiation. *Fungal Genet Biol.* 2008a;45:127–38.
- Bayram Ö. VelB / VeA / LaeA Complex Coordinates Light Signal with Fungal Development. *Science* 2008b; 80.
- Beyhan S, Gutierrez M, Voorhies M, Sil A. A temperature-responsive network links cell shape and virulence traits in a primary fungal pathogen. *PLoS Biol.* 2013;11(7):1–20.

- Blumenstein A, Vienken K, Tasler R, Purschwitz J, Veith D, Frankenberg-Dinkel N, *et al.* The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr Biol.* 2005;15(20):1833–8.
- Bok JW, Keller NP, Bok JW, Keller NP. LaeA, a Regulator of Secondary Metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell.* 2004;3(2):527–35.
- Calvo AM, Bok J, Brooks W, Keller NP. veA Is Required for Toxin and Sclerotial Production in *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(8):4733–9.
- Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66(3):447–59.
- Calvo AM. The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet Biol.* 2008;45:1053–61.
- Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol.* 2000 Aug;3(4):354–8.
- Chang YC, Miller GF. Importance of a Developmentally Regulated Pheromone Receptor of *Cryptococcus neoformans* for Virulence Importance of a Developmentally Regulated Pheromone Receptor of *Cryptococcus neoformans* for Virulence. *Infect Immun.* 2003;71(9):4953–60.
- Chang YC, Penoyer LA, Kwon-Chung K. The second STE12 homologue of *Cryptococcus neoformans* is MATa-specific and plays an important role in virulence. *PNAS.* 2001;98(6):10–5.
- Choi Y, Goodwin SB. MVE1, Encoding the Velvet Gene Product Homolog in *Mycosphaerella graminicola*, Is Associated with Aerial Mycelium Formation, Melanin Biosynthesis, Hyphal Swelling and Light Signaling. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(3):942–53.
- Cox GM, Harrison TS, McDade HC, Taborda P, Heinrich G, Casadevall A, *et al.* Superoxide Dismutase Influences the Virulence of *Cryptococcus neoformans* by Affecting Growth within Macrophages. *Infect Immun.* 2003;71(1):173–80.
- Cox GM, McDade HC, Chen SC, Tucker SC, Gottfredsson M, Wright LC, *et al.* Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* 2001;39(1):166–75.
- Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR. Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. *Infect Immun.* 2000;68(2):443–8.

- Cruz MC, Fox DS, Heitman J. Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J.* 2001 1;20(5):1020–32.
- Davidson RC, Nichols CB, Cox GM, Perfect JR, Heitman J. A MAP kinase cascade composed of cell type specific and non-specific elements controls mating and differentiation of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* 2003;49(2):469–85.
- Dhingra S, Andes D, Calvo AM. VeA regulates conidiation, gliotoxin production, and protease activity in the opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell.* 2012;11(12):1531–43.
- Djordjevic JT. Role of phospholipases in fungal fitness , pathogenicity , and drug development – lessons from *Cryptococcus neoformans*. *Front Microbiol.* 2010;1:1–13.
- Dreyer J, Eichhorn H, Friedlin E, Ku H, Ku U. A Homologue of the *Aspergillus* velvet Gene Regulates both Cephalosporin C Biosynthesis and Hyphal Fragmentation in *Acremonium chrysogenum*. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(10):3412–22.
- Duran RM, Cary JW, Calvo AM. Production of cyclopiazonic acid , aflatoxin , and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by *veA* , a gene necessary for sclerotial formation. *Appl Microbiol.* 2007;73:1158–68.
- Etxebeste O, Garzia A, Espeso EA, Ugalde U. *Aspergillus nidulans* asexual development : making the most of cellular modules. *Trends Microbiol.* 2010;18(12):569–76.
- Evans E E. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A. Serologic classification by means of capsular and agglutination reactions. 1950;64(5):423-30.
- Feldmesser M, Kress Y, Novikoff P, Feldmesser M, Kress Y, Novikoff P. *Cryptococcus neoformans* Is a Facultative Intracellular Pathogen in Murine Pulmonary Infection. *Infect Immun.* 2000;68(7):4225–37.
- Ferro E, Trabalzini L. The yeast two-hybrid and related methods as powerful tools to study plant cell signalling. *Plant Mol Biol.* 2013;83:287–301.
- Fu J, Mares C, Lizcano a, Liu Y, Wickes BL. Insertional mutagenesis combined with an inducible filamentation phenotype reveals a conserved STE50 homologue in *Cryptococcus neoformans* that is required for monokaryotic fruiting and sexual reproduction. *Mol Microbiol.* 2011 Feb;79(4):990–1007.

- Ganendren R, Carter E, Sorrell T, Widmer F, Wright L. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes Infect.* 2006;8(4):1006–15
- Gerik KJ, Bhimoreddy SR, Ryerse JS, Specht C a, Lodge JK. PKC1 is essential for protection against both oxidative and nitrosative stresses, cell integrity, and normal manifestation of virulence factors in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* 2008;7(10):1685–98.
- Gilbert NM, Donlin MJ, Gerik KJ, Specht C a, Djordjevic JT, Wilson CF, *et al.* KRE genes are required for beta-1,6-glucan synthesis, maintenance of capsule architecture and cell wall protein anchoring in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* 2010; 76(2):517–34.
- Hoff B, Kamerewerd J, Sigl C, Mitterbauer R, Zadra I, Kürnsteiner H, *et al.* Two Components of a velvet-Like Complex Control Hyphal Morphogenesis , Conidiophore Development, and Penicillin Biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Eukaryot Cell.* 2010;9(8):1236–50.
- Hu G, Steen BR, Lian T, Sham AP, Tam N, Tangen KL, *et al.* Transcriptional regulation by protein kinase A in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog.* 2007 (3):e42.
- Iidnurm A, Bahn YS, Nielsen K, Lin X, Fraser JA, Heitman J. Deciphering the Model Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nature Rev Microbiol* 2005; 3: 753-64.
- Janbon G, Doering TL (2011) Biosynthesis and Genetics of the *Cryptococcus* capsule In: *Cryptococcus: From Pathogen to Model Yeast*. ASM Press pp.27-41.
- Janbon G, Ormerod KL, Paulet D, Byrnes EJ, Yadav V, Chatterjee G, *et al.* Analysis of the genome and transcriptome of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* reveals complex RNA expression and microevolution leading to virulence attenuation. *PLoS Genet.* 2014;10(4).
- Jiang J, Liu X, Yin Y, Ma Z. Involvement of a Velvet Protein FgVeA in the Regulation of Asexual Development , Lipid and Secondary Metabolisms and Virulence in *Fusarium graminearum*. 2011;6(11).
- Karakat BB, Gold SE, Covert SF. Two members of the *Ustilago maydis* velvet family influence teliospore development and virulence on maize seedlings. *Fungal Genet Biol.* Elsevier Inc.; 2013;61:111–9.

- Kent CR, Ortiz-Bermúdez P, Giles SS, Hull CM. Formulation of a defined V8 medium for induction of sexual development of *Cryptococcus neoformans*. *Appl Environ Microbiol.* 2008 ;74(20):6248–53.
- Kim H, Han K, Kim K, Han D, Jahng K, Chae K. The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 2002;37:72–80.
- Kim H-J, Han J-H, Kim KS, Lee Y-H. Comparative functional analysis of the velvet gene family reveals unique roles in fungal development and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet Biol. Elsevier Inc.*; 2014;66:33–43.
- Kim HS, Kim S-Y, Yoon JK, Lee Y-W, Bahn Y-S. An Efficient Gene-disruption Method in *Cryptococcus neoformans* by double-joint PCR with NAT-split markers. *Biochem Biophys Res Commun* 2009a; 390: 983-88.
- Kim HY, Han K, Lee M, Oh M, Kim H, Zhuxiong X, *et al.* The *veA* gene is necessary for the negative regulation of the *veA* expression in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet.* 2009b;55:391–7.
- Kopke K, Hoff B, Bloemendal S, Katschorowski A, Kamerewerd J, Kück U. Members of the *Penicillium chrysogenum* velvet complex play functionally opposing roles in the regulation of penicillin biosynthesis and conidiation. *Eukaryot Cell.* 2013;12(2):299–310. Available
- Kozubowski L, Lee SC, Heitman J. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cell Microbiol.* 2009;11(3):370–80.
- Krappmann S, Braus GH. Deletion and Allelic Exchange of the *Aspergillus fumigatus* *veA* Locus via a Novel Recyclable Marker Module. *Eukaryot Cell.* 2005;4(7):1298–307.
- Kronstad JW, Hu G, Choi J. The cAMP/Protein Kinase A Pathway and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Mycobiology.* 2011;39(3):143–50.
- Kwon-Chung KJ. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia.* 1976a;68(4):942–6.
- Kwon-Chung KJ. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the Sexual State of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia.* 1976b;68(4):821–33.
- Laskowski-Peak MC, Calvo AM, Rohrssen J, George Smulian a. VEA1 is required for cleistothecial formation and virulence in *Histoplasma capsulatum*. *Fungal Genet Biol. Elsevier Inc.*; 2012 Jul 24 ;1–9.

- Lengeler KB, Davidson RC, Cletus D, Harashima T, Shen W, Wang P, *et al.* Signal Transduction Cascades Regulating Fungal Development and Virulence. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):746–85.
- Li S, Myung K, Guse D, Donkin B, Proctor RH, Grayburn WS, *et al.* FvVE1 regulates filamentous growth, the ratio of microconidia to macroconidia and cell wall formation in *Fusarium verticillioides*. *Mol Microbiol.* 2006;62:1418–32.
- Lin X, Heitman J. Chlamydospore Formation during Hyphal Growth in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* 2005;4(10):1746–54.
- Lin X, Heitman J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Ann Rev Microbiol* 2006; 60: 69-105.
- Lin X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection and evolution. *Infect Genet Evol.* 2009; 9(4):401–16.
- Liu T-B, Wang Y, Stukes S, Chen Q, Casadevall A, Xue C. The F-Box protein Fbp1 regulates sexual reproduction and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* 2011;10(6):791–802.
- López-Berges MS, Hera C, Sulyok M, Schäfer K, Capilla J, Guarro J, *et al.* The velvet complex governs mycotoxin production and virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Mol Microbiol.* 2013 ;87(1):49–65.
- Lu Y, Sun K, Shen W. Blue light negatively regulates the sexual filamentation via the Cwc1 and Cwc2 proteins in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* 2005;56:480–91.
- Merhej J, Urban M, Dufresne M, Hammond-Kosack KE, Richard-Forget F, Barreau C. The velvet gene, FgVe1, affects fungal development and positively regulates trichothecene biosynthesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Mol Plant Pathol.* 2012;13(4):363–74.
- Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, *et al.* Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol.* 2009;47(6):561–70.
- Mooney JL, Yager LN. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.* 1990;4:1473–82.
- Morrow CA, Fraser JA, Varma A, Saijo T, Waldron K, Jong A, *et al.* Is the Nickel-Dependent Urease Complex of *Cryptococcus* the Pathogen's Achilles' Heel? *MBio.* 2013;4(4):4–6.



- Ni M, Yu J-H. A Novel Regulator Couples Sporogenesis and Trehalose Biogenesis in *Aspergillus nidulans*. PLoS One 2007; 2: e970.
- Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RCL, *et al.* Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* Isolates from Clinical and Environmental Sources in Brazil : Analysis of Host and Regional Patterns. J Clin Microbiol. 2003;41(1):73–7.
- O' Meara TR, Alspaugh JA. The *Cryptococcus neoformans* capsule : a Sword and a Shield. Clin Microbiol Rev. 2012;25(3):387–408.
- Odom A, Muir S, Lim E, Toffaletti DL, Perfect J, Heitman J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. EMBO J. 1997 15;16(10):2576–89.
- Olszewski M a, Noverr MC, Chen G-H, Toews GB, Cox GM, Perfect JR, *et al.* Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. Am J Pathol; 2004; 164(5):1761–71.
- Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV / AIDS. Aids 2009. 2009; 23(4):525–30.
- Park H, Ni M, Cheol K, Kim YH, Yu J. The Role, Interaction and Regulation of the Velvet Regulator VelB in *Aspergillus nidulans*. PLoS One. 2012;7(9):1–15.
- Park H-S, Bayram O, Braus GH, Kim SC, Yu J-H. Characterization of the velvet regulators in *Aspergillus fumigatus*. Mol Microbiol. 2012;86(4):937–53.
- Park H-S, Nam T-Y, Han K-H, Kim SC, Yu J-H. VelC Positively Controls Sexual Development in *Aspergillus nidulans*. PLoS One. 2014;9(2):e89883.
- Park M, Do E, Jung WH. Lipolytic enzymes involved in the virulence of human pathogenic fungi. Mycobiology. 2013;41(2):67–72.
- Peconick, LDF. Caracterização molecular e funcional do gene VOSA de *Cryptococcus neoformans* [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2013.
- Petkova MI, Pujol-Carrion N, Arroyo J, García-Cantalejo J, Angeles de la Torre-Ruiz M. Mtl1 is required to activate general stress response through Tor1 and Ras2 inhibition under conditions of glucose starvation and oxidative stress. J Biol. 2010 ;285(25):19521–31.
- Phadke SS, Feretzaki M, Heitman J. Unisexual reproduction enhances fungal competitiveness by promoting habitat exploration via hyphal growth and sporulation. Eukaryot Cell. 2013;12(8):1155–9.

- Pitkin JW, Panaccione DG, Walton JD. A Putative Cyclic Peptide Efflux Pump Encoded by the TOXA gene of the Plant-pathogenic Fungus *Cochliobolus carbonum*. *Microbiol* 1996; 142: 1557-65.
- Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982; 20 (1): 7-14.
- Pukkila-Worley R, Gerrald QD, Kraus PR, Davis MJ, Giles SS, Cox GM, *et al.* Transcriptional Network of Multiple Capsule and Melanin Genes Governed by the *Cryptococcus neoformans* Cyclic AMP Cascade. *Eukaryot Cell*. 2005;4(1):190–201.
- Purschwitz J, Müller S, Fischer R. Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the White Collar protein LreB. *Mol Genet genomics*. 2009;35–42.
- Purschwitz J, Müller S, Kastner C, Schöser M, Haas H, Espeso EA, *et al.* Report Functional and Physical Interaction of Blue- and Red-Light Sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol*. 2008;18:255–9.
- Rutherford JC, Lin X, Nielsen K, Heitman J. Amt2 Permease is Required to Induce Ammonium-responsive Invasive Growth and Mating in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 2008; 7: 237-46.
- Salas BSD, Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Williamson PR. Effect of the laccase gene, CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med*. 1996;184:377–86.
- Schafmeier T, Diernfellner ACR. Light input and processing in the circadian clock of *Neurospora*. *FEBS Lett. Federation of European Biochemical Societies*; 2011 May 20;585(10):1467–73.
- Shi M, Li SS, Zheng C, Jones GJ, Kim KS, Zhou H, *et al.* Real-time imaging of trapping and urease- dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. *J Clin Invest*. 2010;120(5):1683–93.
- Singh A, Panting RJ, Varma A, Saijo T, Waldron KJ, Jong A, *et al.* Factors Required for Activation of Urease as a Virulence Determinant in *Cryptococcus neoformans*. *MBio*. 2013;4(3):1–11.
- Steenbergen JN, Casadevall A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect* 2003;5(7):667–75.

- Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Stephanie D, Casadevall A, Steenbergen JN, Nosanchuk JD, *et al.* *Cryptococcus neoformans* Virulence Is Enhanced after Growth in the Genetically Malleable Host *Dictyostelium discoideum*. *Infect Immun.* 2003;71(9):4862–72.
- Stinnett SM, Espeso EA, Cobeño L, Araújo-Bazán L, Calvo AM. *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin a carrier and on light. *Mol Microbiol.* 2007;63:242–55.
- Tscharke RL, Lazera M, Chang YC, Wickes BL, Kwon-chung KJ. Haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans* is not mating type a-specific. *Fungal Genet Biol.* 2003;39:230–7.
- Vecchiarelli A, Pietrella D, Lupo P, Bistoni F, Mcfadden DC, Casadevall A. The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation. *J Leukoc Biol.* 2003;74:370–8.
- Velagapudi R, Hsueh Y-P, Geunes-Boyer S, Wright JR, Heitman J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 2009;77(10):4345–55.
- Voelz, K; May RC. Cryptococcal interactions with the host immune system. *Eukaryot Cell.* 2010;9(6):835–46.
- Walton FJ, Idnurm A, Heitman J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* 2005;57:1381–96.
- Wang L, Lin X. Mechanisms of unisexual mating in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet Biol.*; 2011;48:651–60.
- Wang Y, Casadevall A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light . *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(10):3864–6.
- Webster RH, Sil A. Conserved factors Ryp2 and Ryp3 control cell morphology and infectious spore formation in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. 2008;105(38).
- Wickes BL, Mayorga ME, Edman U, Edman JC. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: Association with the a-mating type. *Microbiology.* 1996;93:7327–31.
- Wickes BL. The role of mating type and morphology in *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Int J Med Microbiol.* 2002;292(5-6):313–29.
- Wiemann P, Brown DW, Kleigrewe K, Bok JW, Keller NP, Humpf H, *et al.* FfVe1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in *Fusarium fujikuroi*, affect

- differentiation, secondary metabolism and virulence. *Mol Microbiol.* 2010;77(4):972–94.
- Xue C, Hsueh Y-P, Chen L, Heitman J. The RGS protein Crg2 regulates both pheromone and cAMP signalling in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* 2008;70(2):379–95.
- Xue C, Tada Y, Dong X, Heitman J. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. *Cell Host Microbe.* 2007; 1:263–73.
- Yang Q, Chen Y, Ma Z. Involvement of BcVeA and BcVeIB in regulating conidiation, pigmentation and virulence in *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet Biol.* Elsevier Inc.; 2013 ;50:63–71
- Yu J-H. Regulation of Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Microbiol* 2010; 38: 229-37.
- Zaragoza O, Chrisman CJ, Castelli MV, Frases S, Cuenca-estrella M, Rodríguez-Tudela JL, *et al.* Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol.* 2008;10(10):2043–57.