

Hugo Costa Paes

Caracterização do módulo regulador do fator
de transcrição Mlc1 de *Cryptococcus neoformans*

Tese apresentada como
requisito parcial à obtenção do
título de doutor pelo programa
de pós-graduação em Patologia
Molecular da Universidade de
Brasília.

Brasília, 11 de março de 2016.

Banca examinadora

Professora Doutora Maria Sueli Soares Felipe (presidente)

Professor Doutor Gustavo Henrique Goldman

Professor Doutor Charley Christian Staats

Professora Doutora Ildinete Silva Pereira

Professor Doutor Sébastien Charneau

Professora Doutora Anamélia Lorenzetti Bocca (suplente)

Sumário

Resumo.....	1
Abstract	2
Introdução.....	3
O gênero <i>Cryptococcus</i> e a criptococose	3
Atributos de virulência de <i>C. neoformans</i>	6
Sinalização morfogênica e adaptativa em <i>C. neoformans</i>	11
Avanços recentes no estudo de fatores de transcrição em <i>C. neoformans</i>	13
A família Gti1/Pac2 de fatores de transcrição	15
Justificativa.....	21
Objetivos	21
Metodologia.....	22
Considerações gerais.....	22
Cepas de micro-organismos e protocolos de cultura vegetativa.....	23
Macrófagos.....	24
Lepidópteros	24
Transformação de <i>C. neoformans</i> por biobalística	24
Extração de DNA genômico de <i>C. neoformans</i>	26
Sistemas comerciais de baixa complexidade	28
Produção dos cassetes de deleção e reconstituição do gene <i>MLC1</i> por PCR.....	29
Confirmação de deleção ou reconstituição do <i>locus MLC1</i> por hibridação em membrana de DNA	29
Fenótipos de crescimento <i>in vitro</i> que derivam da expressão de fatores de virulência ou de resistência a estresse de <i>C. neoformans</i>	32
Curvas de crescimento fúngico	33
Acasalamento.....	34
Ensaio de atividade fungicida de macrófagos em cultura ⁶²	34
Ensaio de virulência fúngica em <i>G. mellonella</i> ²⁸	38
Ensaio de virulência em camundongo	39
Avaliação da carga fúngica pulmonar e cerebral	40
Histopatológico pulmonar.....	40
Medição de cápsula.....	40
Detecção de GXM capsular	41
Dosagem de GXM secretada por ELISA ⁶⁷	41
Extração de RNA total de <i>C. neoformans</i> e seqüenciamento de RNA	41
Bioinformática	43

PCR em tempo real.....	43
Citocalização da proteína Mlc1	43
Soluções complexas	44
Resultados.....	47
Estrutura do gene <i>MLC1</i>	47
Deleção e reconstituição do gene <i>MLC1</i>	48
Fenótipos negativos do mutante <i>mlc1</i>	49
Produção de cápsula e secreção de GXM no mutante <i>mlc1</i>	52
Defeito de crescimento no mutante <i>mlc1</i>	53
Defeito de citocinese no mutante <i>mlc1</i>	53
Déficit de virulência do mutante <i>mlc1</i>	54
Citocalização da proteína Mlc1	59
Análise do transcriptoma do mutante <i>mlc1</i>	60
O mutante <i>mlc1</i> não apresenta um defeito de acasalamento	67
Discussão.....	68
Conclusões e perspectivas	74
Apêndice.....	75
Tabela I – iniciadores.....	75
Tabela II: genes diferenciais no mutante <i>mlc1</i> em CIM a 37 °C por quatro horas.....	79
Bibliografia	98

Every mother thinks her child is an oak,
but the world never lacks for cabbages.

Robertson Davies, *World of Wonders*

Resumo

Fatores de transcrição da família Gti1/Pac2 ocorrem exclusivamente em fungos e foram cooptados pela evolução para desempenhar papéis reguladores distintos de acordo com a espécie, papéis esses que vão do controle da transição micélio-levedura e virulência em fungos termodimórficos, à regulação do acasalamento em *Candida* e do metabolismo secundário em patógenos de plantas. Como essas são funções-chaves para patogênese, levantamos a hipótese de que o homólogo em *Cryptococcus neoformans* poderia também controlar a virulência, no caso em questão de um importante patógeno fúngico de humanos, que causa uma doença que vitima centenas de milhares de pessoas todo ano. O mutante para o gene que caracterizamos retém a capacidade de secretar diversas substâncias associadas à virulência – melanina, urease e fosfolipase – mas é hipocapsular e tem um defeito de citocinese e de crescimento a 37 °C. É avirulento em camundongos e hipovirulento em *Galleria* a 30 °C, o que indica que a temperatura do hospedeiro não é a única razão para o fenótipo observado. Além disso, a análise de RNA-Seq mostra que na ausência da proteína correspondente, a expressão da maioria das ORFs codantes do *locus MAT* é parcial ou completamente reprimida a 37 °C num meio de cultura de células. Entretanto, o mutante não apresenta um defeito na iniciação do acasalamento. Estes resultados dão suporte à idéia de que acasalamento e a resposta a estresses ambientais são mecanismos que evoluíram paralelamente, e é o primeiro relato de um fator de transcrição que controla o locus MAT de um patógeno fúngico num contexto independente do acasalamento. A proteína foi, portanto, nomeada MAT locus controller 1 (“controladora do *locus MAT* 1”, Mlc1).

Abstract

Gti1/Pac2 transcription factors occur exclusively in fungi and have been co-opted during evolution to perform distinct regulatory roles according to species, ranging from yeast-to-mycelium transition and virulence in dimorphic fungi, to mating in *Candida* and secondary metabolism in plant pathogens. As these roles are important in causing disease, we hypothesized that the *Cryptococcus neoformans* homologue could also control virulence in this important fungal pathogen, which causes a disease that kills hundreds of thousands of people each year. The mutant for this gene retains the ability to secrete several substances associated with virulence – melanin, urease and phospholipase – but is hypocapsular and has a cytokinesis and a growth defect at 37 °C. It is avirulent in mice and hypovirulent in *Galleria* at 30 °C, which indicates that host temperature is not the only reason. Furthermore, RNA-Seq analysis shows that in the absence of the protein, the expression of most protein-coding ORFs of the *MAT* locus is partial or completely repressed at 37 °C in a cell culture medium. However, the mutant does not have a defect in mating initiation. These results support the idea that mating and the response to environmental stress are co-evolved mechanisms, and is the first report of a transcription factor that controls the *MAT* locus of a fungal pathogen in a mating-unrelated context. The protein has thus been named MAT locus controller 1 (Mlc1).

Introdução

O gênero *Cryptococcus* e a criptococose

Dentre os patógenos humanos, os fungos causadores de infecções sistêmicas merecem especial atenção. Como eucariotos, eles impõem dificuldades à terapêutica, uma vez que muitos de seus mecanismos moleculares que poderiam servir de alvo para agentes quimioterápicos são compartilhados com as células do hospedeiro; não por outro motivo, muitos dos antifúngicos existentes possuem efeitos colaterais significativos¹. Outros têm ação restrita a algumas espécies, e a eficácia global dessa classe de medicamentos no controle de micoses sistêmicas é insatisfatória².

Além disso, e ao contrário dos demais patógenos eucarióticos – tais como helmintos e protistas –, a maioria dos fungos possui ciclo de vida completo sem a necessidade de um hospedeiro animal, e as doenças correspondentes não apresentam transmissibilidade inter-individual (as exceções mais notáveis são *Candida albicans* e *Pneumocystis jirovecii*, que não possuem formas ambientais conhecidas). Micoses sistêmicas provocadas por fungos ambientais são, via de regra, contraídas pela inalação de propágulos ambientais (esporos, fragmentos de hifas e leveduras ressecadas) e o sucesso da infecção depende, na maioria dos casos, do estado imunitário do hospedeiro humano.

Portanto, as micoses sistêmicas podem ser divididas em oportunistas e primárias. O primeiro grupo, que corresponde à maioria dos casos, tem importância crescente em função do aumento da população de pacientes imunossuprimidos, com particular destaque para os portadores de HIV³. Especialmente vulneráveis são os portadores de imunossupressão terapêutica de longo prazo: além de pacientes oncológicos em regime quimioterápico, transplantados e acometidos de doenças

autoimunes, ambos os quais são mantidos sob imunomodulação constante para evitar a recidiva dos sintomas³.

Quatro patógenos provocam a maioria das infecções oportunistas: *P. jirovecii*, *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*. O primeiro é um ascomiceto comensal obrigatório, específico de seres humanos, cuja mortalidade se dá por pneumonia⁴. O segundo é um ascomiceto integrante da microbiota da maioria dos seres humanos cuja mortalidade se dá por sepse e infecção renal; morfologicamente, é um fungo pleiomórfico que forma um biofilme invasor responsável pela patogênese, e cujas formas de micélio e levedura respondem por aspectos da doença⁵. O terceiro é um ascomiceto ambiental, cujo crescimento vegetativo é exclusivamente filamentoso e que provoca mortalidade por pneumonia⁶.

C. neoformans, por sua vez, é um basidiomiceto. Ele e a espécie-irmã *C. gattii* são os únicos representantes do filo Basidiomycota que infectam humanos regularmente. Criptococos são leveduras de vida livre, encapsuladas, normalmente isoladas de matéria vegetal (uma associação clássica, no caso *C. gattii*, é com eucaliptos) ou de excretas de aves (pombos em especial)⁷. Estima-se que a quase totalidade de população humana entra em contato com leveduras dessecadas e esporos de *Cryptococcus* regularmente, e anticorpos contra componentes desses fungos são detectáveis em até 100% da população adulta, dependendo do estudo⁸.

Enquanto ascomicetos tipicamente provocam infecções pulmonares (fungos termo-dimórficos) ou múlti-viscerais (*Candida*), e os dois basidiomicetos se distinguem dos demais fungos patogênicos por seu pronunciado neurotropismo: a criptococose é uma forma agressiva de meningoencefalite, cuja mortalidade, mesmo na vigência de tratamento, pode chegar a 70%⁹. Anualmente, estima-se que mais de 600.000 pessoas morram da doença no mundo⁹, e os sobreviventes não raro apresentam sequelas neurológicas importantes. A criptococose é condição definidora de AIDS – assim como tuberculose, toxoplasmose e outras – e a população de aidéticos na África subsaariana responde pela maioria dos casos⁹.

Finalmente, além da infecção oportunista, provocada por *C. neoformans*, uma preocupação epidemiológica emergente é o aumento do número de casos de infecção primária, provocada principalmente por *C. gattii*. Uma forma particularmente agressiva de criptococose *gattii* se iniciou a partir da cidade de Vancouver (Colúmbia Britânica, Canadá), de onde tem se espalhado para o noroeste da costa do Pacífico¹⁰.

O diagnóstico de criptococose se dá por detecção direta do fungo em líquido pelo teste da tinta nanquim, que evidencia a cápsula do fungo, ou por cultura direta a partir de amostras de tecido; o fungo também pode ser detectado como uma levedura em brotamento por meio de observação histopatológica¹¹. O tratamento-padrão da criptococose¹¹ é feito por uma fase de indução de duas semanas com anfotericina B (forma de deoxicolato a 0,7-1 mg/kg/dia; ou formulação lipossomal a 3-6 mg/kg/dia) mais outro antifúngico, que pode ser a flucitosina (100 mg/kg/dia) ou o fluconazol (800-1200 mg/dia), seguida de uma fase de consolidação usando apenas o fluconazol por oito semanas a 400 mg/kg/dia, e uma fase de manutenção com fluconazol a 200 mg/kg/dia durante até um ano.

A resposta imunitária do hospedeiro humano ao criptococo é tanto essencial para o controle da infecção como parte do mecanismo de disseminação dele pelo organismo, como componente do dano tecidual e da letalidade provocada pela doença¹². Embora os componentes humorais inato (complemento) e adaptativo (anticorpos) da resposta tenham papel na supressão do patógeno, a resposta celular é a maior responsável. A fagocitose por macrófagos seguida de eliminação do fungo é o principal mecanismo, mas o macrófago também é responsável pela disseminação do criptococo para sítios distantes do ponto de entrada pulmonar, tais como o sistema nervoso central¹². Além disso, um das causas de letalidade pelo criptococo em pacientes imunossuprimidos é a síndrome inflamatória de reconstituição imunitária (IRIS)¹¹, uma forma exacerbada de resposta que pode causar danos teciduais extensos e provocar morte do paciente, e particularmente

comum quando se inicia terapia anti-retroviral em pacientes de criptococose sem que esta tenha sido controlada.

Além da meningoencefalite, a pneumonia é componente significativo da letalidade por *Cryptococcus*, especialmente em aidéticos¹¹, por *C. neoformans*, e em imunocompetentes, por *C. gattii*. Embora a maioria dos achados de criptococose pulmonar sejam nódulos granulomatosos solitários e assintomáticos, o quadro agudo pode rapidamente evoluir para síndrome de desconforto respiratório e exigir intervenção terapêutica. O criptococo pode atingir outros órgãos, tais como pele, próstata, globo ocular e ossos¹¹.

Uma das hipóteses vigentes sobre a evolução dos criptococos patogênicos postula que *C. gattii* surgiu na região da bacia amazônica e de lá se espalhou globalmente, adaptando-se, em contraste com a maioria dos fungos dimórficos, a zonas temperadas¹³. Quanto a *C. neoformans*, dados recentes sugerem uma dispersão a partir da África subsaariana¹⁴.

C. neoformans e *C. gattii* englobam, na verdade, pelo menos nove espécies filogeneticamente distinguíveis¹⁵. Para todos os efeitos práticos, as duas espécies patogênicas de *Cryptococcus* são equivalentes no tocante às formas de crescimento e aos fatores de virulência, de modo que, doravante, tratar-se-á apenas de *C. neoformans*.

Atributos de virulência de *C. neoformans*

O principal agente causador da criptococose é uma levedura que se reproduz por mitose seguida de brotamento. Existem duas sorovariantes, *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans*. As células são encontradas, *in vitro*, isoladas ou em pares de mãe e filha, ou ainda em aglomerados pequenos. Como a maioria dos fungos, possuem parede celular composta de beta-glucana e quitina, mas são ainda envolvidas por uma cápsula polissacarídica¹⁶.

Além da capacidade de crescer a 37 °C, essa cápsula é um dos fatores fundamentais para que o criptococo estabeleça infecção no hospedeiro humano. Sempre presente em baixos níveis, a cápsula é fortemente induzida *in vivo*, ou mediante determinadas condições *in vitro*, e sua espessura pode exceder significativamente o diâmetro do corpo celular (figura 1).

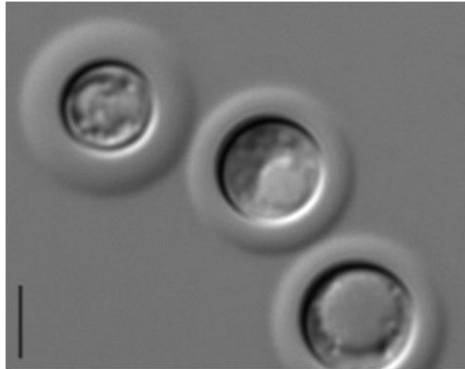


Figura 1. Células de *C. neoformans* cepa H99 cultivadas em meio mínimo líquido por 24 horas e ressuspensas em Percoll® (1:1 em água). Microscopia de contraste de interferência diferencial. Observe a cápsula como uma região de relevo ao redor do corpo celular. Barra, 5 µm.

A cápsula é composta principalmente de glucuronoxilomanana (GXM) e, em menor proporção, de glucuronoxilomanogalactana (GXMGal), além de manoproteínas¹⁷. Sabe-se que ela é responsável por proteger a levedura da fagocitose na ausência de anticorpos opsonizantes, permitir sua reprodução no interior de macrófagos e exercer efeitos imunomoduladores vantajosos para o fungo¹⁷. Observações *in vivo* e *in vitro* determinaram que polissacarídeos capsulares são secretados no meio de cultura e encontrados na corrente sanguínea de pacientes e animais infectados¹⁷. Esses componentes capsulares secretados também possuem função imunomoduladora, e em estudos de mutantes de cápsula, a dosagem da GXM secretada é levada em consideração como indicativa de perda ou defeito de virulência¹⁸.

Outro fator importante de virulência é a capacidade de melanização do criptococo. Mesmo em comparação com outras espécies do gênero *Cryptococcus*, as espécies patogênicas produzem o pigmento em grande quantidade e ele

desempenha funções antioxidantes, antifagocíticas e imunomoduladoras¹⁹. Cepas amelanocíticas são avirulentas e o pigmento é essencial para o sucesso da infecção no sistema nervoso central. A melanina, por suas características físico-químicas, também é capaz de sequestrar grande variedade de substâncias, inclusive antifúngicos e peptídeos antimicrobianos, conferindo maior resistência da levedura a sua presença¹⁹.

Outros fatores de virulência em *C. neoformans* possuem papéis mais específicos. A fosfolipase B1 (Plb1) é necessária para a invasão do tecido pulmonar e contribui para a sobrevivência no interior do macrófago²⁰, enquanto a urease é necessária para que a levedura atravesse a barreira hemato-encefálica e colonize o sistema nervoso central²¹.

A forma leveduriforme e de expansão clonal de *C. neoformans* é predominante, mas não única: o fungo possui ciclo sexual conhecido e a forma teleomórfica é conhecida como *Filobasidiella neoformans*²². Conforme a nomenclatura usual em fungos, os parceiros sexuais se denominam a e g. A fusão de parceiros resulta no crescimento filamentosos (hifa dicariótica). A porção terminal do filamento se desenvolve no formato de basídio, onde ocorre a fusão de núcleos, meiose e a formação de cadeias de basidiósporos. Ambas as formas são capazes de provocar infecção, mas a forma g é tida como mais agressiva e mais propensa a invadir o sistema nervoso central, embora não esteja claro se isso se trata de um artefato de notificação epidemiológica, ou do fato de que, em co-infecção, a forma a apresenta menor neurotropismo^{23,24}.

Além da reprodução sexuada, *C. neoformans* apresenta uma forma de ciclo parassexual²², a frutificação monocariótica, em que ocorre a fusão de células do mesmo tipo sexual, seguida da formação de uma hifa monocariótica (núcleo diplóide), que desenvolve um basídio e sofre meiose, gerando basidiósporos da mesma forma que o ciclo sexual. Morfologicamente, a hifa monocariótica difere da dicariótica pelas junções, que não são comunicantes entre os compartimentos

septados no caso da primeira. As duas formas filamentosas são ilustradas na figura 2²⁵.

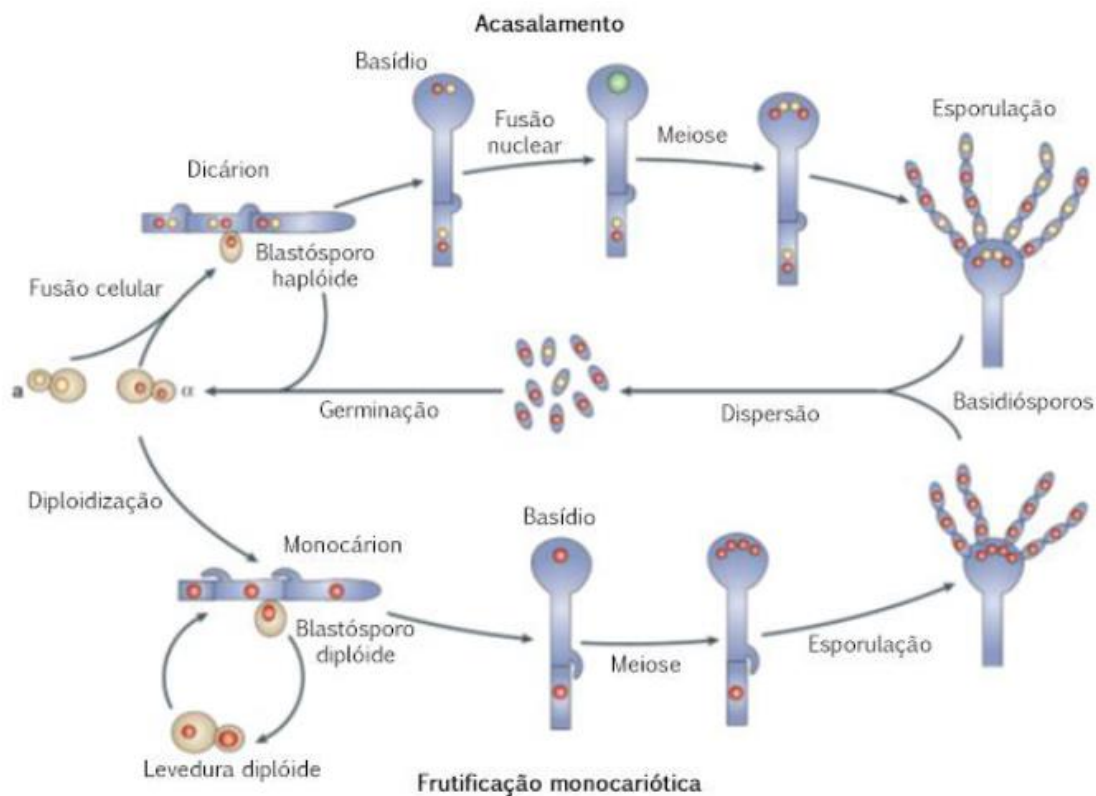


Figura 2. Acasalamento (metade superior) e frutificação monocariótica (metade inferior) em *C. neoformans*. Observe a formação de blastósporos haplóides e diplóides ao longo dos filamentos; estas formas também podem ser responsáveis pela preservação ambiental do fungo. A dispersão se dá pelos basidiósporos em ambos os casos. Detalhes no texto. Adaptada da referência 25.

O ciclo ambiental do criptococo é completo e não há transmissão inter-individual do patógeno. Isso suscita a questão: que vantagens adaptativas os fatores de virulência trazem para um fungo de vida livre? A pergunta, que se aplica também aos demais fungos oportunistas ambientais, está mais perto de ser elucidada em *Cryptococcus*. De acordo com a hipótese do fagócito ambiental, enunciada por Casadevall e colaboradores²⁶, a infecção de mamíferos seria um acidente evolucionário resultante da adaptação do criptococo a predadores naturais, tais como amebas e helmintos. Com efeito, *C. neoformans* possui modelos de infecção na ameba *Acanthamoeba castellanii*, no verme *Caenorhabditis elegans*²⁷, na forma larval do lepidóptero *Galleria mellonella*²⁸, entre outros, e resultados recentes indicam que a

resposta adaptativa do fungo a *A. castellanii* é bastante semelhante à que se verifica após ingestão por macrófagos pulmonares²⁹. O ciclo de vida de *C. neoformans*, incluindo o contato acidental com humanos, está ilustrado à figura 3²⁵.

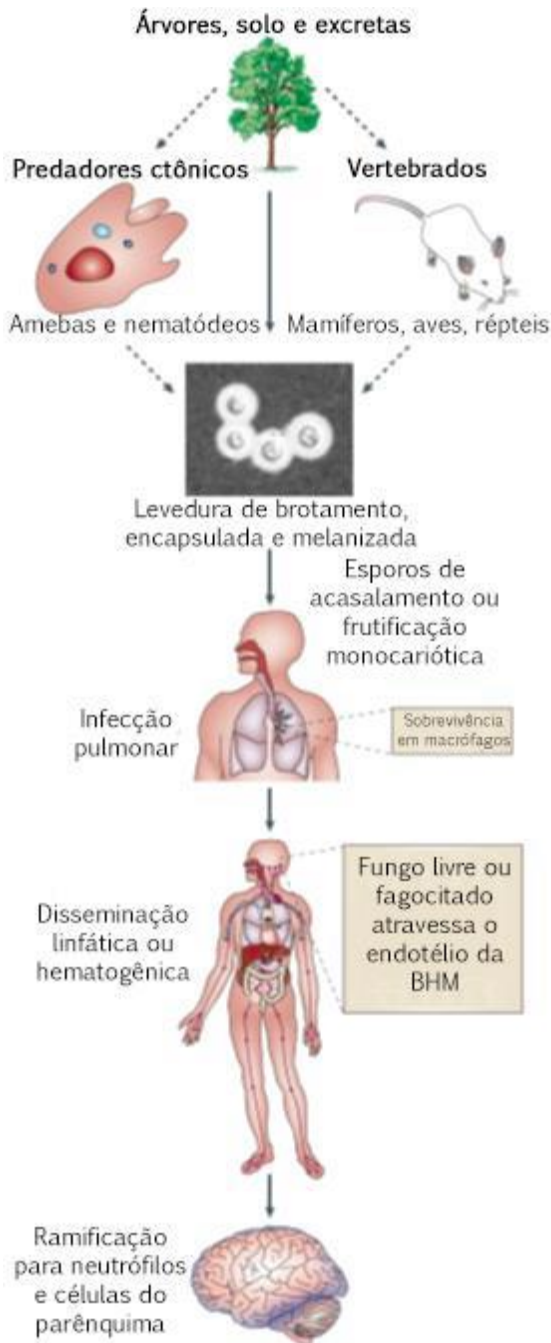


Figura 3. O ciclo de vida ambiental de *C. neoformans* e a infecção em seres humanos. A disseminação no hospedeiro humano se dá por via hemolinfática e postula-se que macrófagos e células endoteliais permitam a travessia da levedura encapsulada para o sistema nervoso central. BHE, barreira hemato-encefálica. Adaptada da referência 25

Sinalização morfogênica e adaptativa em *C. neoformans*

A transição do ambiente de vida livre para o hospedeiro mamífero impõe múltiplos desafios para o criptococo: num curto espaço de tempo, a levedura tem de se adaptar a uma temperatura mais alta, a uma disponibilidade de micronutrientes distinta daquela encontrada em vida livre e a uma série de estresses provocados pelas defesas inatas e adaptativas do hospedeiro, tais como a fagocitose, a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, a produção de peptídeos antimicrobianos e a acidificação do fagossomo. Como visto acima, os chamados fatores de virulência correspondem a modificações metabólicas e morfológicas do fungo para fazer frente ao novo ambiente e permitir a colonização do hospedeiro. Dentre elas, as mais importantes são a termotolerância e a produção de cápsula e melanina. Portanto, para o entendimento da infecção foi imperativo entender como o criptococo usa os sinais externos para coordenar a reprogramação transcricional que resulta na expressão desses fatores²⁵.

Dentre as vias de sinalização implicadas na virulência de *C. neoformans*, a mais bem estudada pertence à categoria de vias de proteínas G heterotriméricas. Encabeçada pela proteína G α Gpa1, essa via tem o AMP cíclico (cAMP) como segundo mensageiro e, através de uma proteína cinase A (Pka1), resulta na indução da cápsula e na melanização³⁰. Múltiplos fatores de transcrição respondem à via, dos quais Nrg1 (“regulador negativo de genes reprimidos por glicose”, nome originário do homólogo de *S. cerevisiae*) foi estudado em detalhe³¹.

Em seguida, obteve-se bom entendimento da via da proteína G monomérica Ras1. Esta via responde pela termotolerância de *C. neoformans* através da repolarização do citoesqueleto de actina³²: mutantes *ras1* sofrem despolarização permanente dos microfilamentos e parada do brotamento a 37 °C, e por isso são avirulentos em modelo mamífero. Além disso, esses mutantes sofrem com outros tipos de estresse que podem ser encontrados no hospedeiro, sendo pouco

tolerantes a estresse salino e hipóxia. Efeitores de Ras1 incluem o fator de permutação de nucleotídeos de guanina Cdc24, a proteína Cdc42 e a cinase Ste20³².

Outras vias de sinalização são importantes para a adaptação de *C. neoformans* a diversas formas de estresse. Duas delas são vias de cinases ativadas por mitógeno (MAPK). Uma delas³³ é iniciada por receptores do tipo bicomponente, em que uma histidina cinase híbrida (Tco1 e/ou Tco2) capta um sinal de estresse – hipóxia, pressão osmótica ou espécies reativas de oxigênio – e fosforila uma proteína acopladora (em *C. neoformans*, a principal candidata é Ypd1). Esta transfere o sinal para uma cascata de fosforilação encabeçada pela MAPKKK Ssk1, e resulta na fosforilação de Hog1. Hog1 fosforilada, por si só, inibe a produção de cápsula e a melanização (porém, as demais vias de sinalização podem se contrapor a esse estímulo), mas induz resistência ao estresse oxidativo, osmótico, hipóxico e a antifúngicos²⁵.

A outra via de MAP cinases capta sinais principalmente térmicos, de estresse de parede e de radicais de nitrogênio³³: o receptor é desconhecido, mas a cascata é coordenada pela proteína cinase C (Pkc1), que fosforila a MAPKKK Bck1, ao cabo, a MAPK Mpk1, que por sua vez permite o crescimento em altas temperaturas e na presença de estresse nitrosativo ou de agentes perturbadores de parede como o Vermelho Congo (CR) e o Calcoflúor Branco (CFW).

Uma terceira via é a das respostas mediadas por cálcio (Ca²⁺), cujos níveis intracelulares se elevam em resposta a alta temperatura e estresse de parede. As proteínas que captam e transmitem o sinal são, respectivamente, a calmodulina e a calcineurina. Esta última é uma fosfatase que precisa da primeira para ser ativada. A partir de uma cascata de componentes ainda pouco conhecidos, a via da calcineurina ativa a expressão de proteínas de síntese de parede como a beta 1,3-glucana sintase Fks1³⁴ e é necessária para o crescimento a 37 °C³⁵.

Mais recentemente, elucidou-se a via Rim em *C. neoformans*, que é responsável pela resposta do fungo ao pH alcalino³⁶, e que ilustra, pela significativa diferença em relação à via Rim de *Saccharomyces cerevisiae*, que mesmo estímulos físico-químicos fundamentais como a mudança de pH são captados de forma diferente dentro de um mesmo reino. Enquanto que em *S. cerevisiae* a via Rim exige atividade de proteína G, em *C. neoformans* ela depende de um receptor não conservado filogeneticamente (Rra1) e passa por um conjunto distinto de proteínas carreadoras de sinal³⁶.

Avanços recentes no estudo de fatores de transcrição em *C. neoformans*

Fatores de transcrição (FTs) formam a interface entre as vias de sinalização e o genoma de um organismo. Cascatas de sinalização tendem a ser bem conservadas dentro de um mesmo reino, mas a co-optação evolutiva de diferentes fatores de transcrição permite que uma mesma via comande fenômenos distintos de uma espécie a outra pela mobilização de FTs diferentes. Em vista disto, o estudo de determinada via de sinalização celular em dado organismo há que ser acompanhado de uma investigação dos FTs modulados por ela, para que se atinja uma síntese entre estímulo, regulação gênica e fenótipo, como ocorreu em *C. neoformans* recentemente para as vias de regulação da cápsula e da resposta ao pH^{18,36}. Da mesma forma, homólogos de um determinado fator de transcrição em diferentes espécies podem modular a expressão de partes diferentes do genoma de cada uma, a depender da ocorrência de sítios de ligação para aquele fator. Portanto, o estudo de um fator de transcrição associado a determinado fenótipo de interesse permite não apenas identificar as vias de sinalização associadas a ele³⁶, como também os genes efetores responsáveis pelo dito fenótipo³⁷.

Não por outro motivo, também em fungos patogênicos mapear os módulos reguladores – ou seja, o conjunto de genes a eles responsivos – de FTs, assim como classificar os FTs de acordo com seu papel na expressão de fenótipos

associados à virulência, é conhecimento indispensável para a identificação dos mecanismos exatos pelos quais cada patógeno coloniza seu hospedeiro.

O interesse clínico de *C. neoformans*, aliado à facilidade de manipulá-lo geneticamente, permitiu que, ao longo de anos, se acumulassem informações a respeito dos FTs implicados em mecanismos de virulência e adaptação do fungo ao hospedeiro^{38,39}. Esses esforços culminaram na publicação recente de estudos de deleção gênica em larga escala que geraram cepas nocaute para a maioria dos fatores de transcrição de *C. neoformans*.

O maior desses estudos, por Yong Sun-Bahn e colaboradores⁴⁰, gerou 322 mutantes independentes de 155 fatores de transcrição da cepa prototípica H99 (*C. neoformans* variedade *grubii*, tipo sexual α). Os pesquisadores varreram esses mutantes quanto à expressão de 32 fenótipos de interesse, e foram capazes de construir redes de correlação de Pearson que indicavam fenótipos co-regulados. O grupo também foi capaz de identificar 19 FTs essenciais para a viabilidade do fungo. Um banco de dados para consulta foi gerado (<http://tf.cryptococcus.org>).

O outro estudo em larga escala, conduzido por Tamara Doering e Michael Brent¹⁸, combinou algoritmos preditivos de função e mutantes de múltiplos fatores de transcrição para mapear extensamente a rede reguladora da formação de cápsula em *C. neoformans*. Os pesquisadores não apenas triplicaram o número de FTs reconhecidamente implicados na regulação da síntese de cápsula, como os hierarquizaram quanto à importância e temporalidade no processo. Além disso, eles demonstraram que seu método de análise permite, a partir do entendimento das relações entre FTs e determinado fenótipo, identificar genes efetores cujo papel fenotípico era até então desconhecido, o que aumenta os candidatos a novos alvos terapêuticos¹⁸.

Combinados, os dois estudos tornam *C. neoformans* o patógeno fúngico com maior quantidade de informação sobre FTs disponível⁴⁰. Contudo, nenhum deles foi exaustivo: o primeiro usou assinaturas estruturais de famílias de FTs bem

conhecidas para selecionar os candidatos à deleção⁴⁰; o segundo usou uma abordagem iterativa para ampliar o número de FTs implicados no fenótipo de interesse *a partir de um conjunto de mutantes de genes previamente descritos na literatura*¹⁸. Em outras palavras, apesar de seu grande poder preditivo, o viés de origem introduzido pelo uso de mutantes já conhecidos significa que FTs pertencentes a redes de regulação dissociadas daquelas comandadas pelos FTs pré-selecionados para análise podem não ser revelados pelo estudo.

A família Gti1/Pac2 de fatores de transcrição

Dentre os fatores de transcrição próprios de fungos (ou seja, sem homólogos em metazoários), uma família se destaca por seu papel morfogênico: trata-se da família Gti1/Pac2 de fatores não-responsivos ao cAMP. Os genes que dão nome a ela, Gti1 e Pac2, foram identificados e caracterizados na levedura de fissão, *Schizosaccharomyces pombe*. O primeiro deles a ser descoberto foi Pac2 (acrônimo inglês para “complementação de Pat1”), há vinte anos, e foi encontrado numa busca por supressores da proteína cinase Pat1, que regula a reprodução sexuada de *S. pombe*⁴¹. A caracterização do mutante *pac2* mostrou que a proteína controla a expressão do fator de transcrição Ste11, ligado ao acasalamento, por uma via de sinalização independente de cAMP. O segundo, Gti1 (“indutor de transporte de gluconato”), foi descoberto como um regulador da captação de gluconato mediante privação de glicose e, novamente, sua atividade não apenas é independente de cAMP como a via que coordena Gti1 é antagônica à via adenilato ciclase-PKA⁴².

Esses dois fatores eram uma curiosidade da biologia da levedura de fissão até 2006, quando vários grupos relataram independentemente a descoberta do fator Wor1 (“regulador de branco ou opaco”) em *C. albicans* como sendo responsável pela transição entre os fenótipos de colônia branca e opaca nesse patógeno⁴³⁻⁴⁵. Esses fenótipos, cujo mecanismo de alternância era até então pouco

compreendido, determinam não apenas a aparência das células e colônias, mas a propensão delas ao acasalamento, as preferências metabólicas e a afinidade por diferentes compartimentos do organismo hospedeiro. Em *S.cerevisiae*, o homólogo de Gti1, Mit1 (“expressão de Muc1 independentemente de Tec1”), é responsável pelo crescimento na forma de pseudo-hifa invasora⁴⁶.

Nos anos que se seguiram, outros membros da família foram identificados. De interesse como patógeno humano, *Histoplasma capsulatum* tem a transição dimórfica de micélio (à temperatura ambiente) para levedura (a 37 °C), essencial para estabelecimento da infecção, coordenada pela ativação do fator de transcrição Ryp1 (“requerido para crescimento como levedura”), um homólogo de Gti1. O mutante *ryp1* é avirulento; estudos de microarranjo constaram que mais de 1.300 genes têm regulação perdida mediante a deleção do fator, e cerca de 700 possuem a proteína Ryp1 conjugada a seus promotores^{37,47}.

Em patógenos de planta, os homólogos de Pac2 e Gti1 também foram parcialmente caracterizados. Em *Magnaporthe oryzae*, o agente causador da brusone do arroz, as proteínas MoPac2 e MoGti1 têm papéis complementares, mas distintos, na patogênese, na produção de hidrofobinas extracelulares e na formação de conídios⁴⁸: MoGti1 tem localização nuclear confirmada e age ainda na invasão dos tecidos da planta e na formação de apressórios. Já em *Fusarium oxysporum*, nome dado a um táxon compreendendo múltiplos patógenos de plantas e metazoários, o homólogo de Gti1, chamado de Sge1 (“expressão do gene SIX”), afeta a conidiação e o desenvolvimento de doença no tomateiro, enquanto que o homólogo de Pac2, FoPac2, tem apenas uma função modesta na patogenicidade⁴⁹. Também já foi estudado o homólogo de Ryp1 em *Botrytis cinerea*, o fungo responsável pela podridão cinzenta em diversos vegetais. A proteína, Reg1 (“regulador 1”), também é necessária para a conidiação e patogenicidade (mas não na invasão dos tecidos), além de conferir resistência ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio e ser essencial para a produção de toxinas pelo

metabolismo secundário⁵⁰. No mesmo estudo, os autores demonstraram, analisando as sequências de diversos fungos, que não apenas a maioria deles (*Neurospora crassa* é a exceção) possui dois membros da família, como um dos membros pertence ao clado filogenético de Gti1 e o outro, ao de Pac2⁵⁰.

Um resumo das funções conhecidas de fatores da família Gti1/Pac2 nos diversos ascomicetos pode ser visto à tabela 1.

Tabela 1. Funções conhecidas dos genes da família Gti1/Pac2 em ascomicetos. Os campos marcados com (?) denotam funções não investigadas.

Espécie	Função		Referência
	Gti1	Pac2	
<i>S. pombe</i>	Captação de gluconato	Acasalamento	41,42
<i>S. cerevisiae</i>	Pseudo-hifa	?	46
<i>C. albicans</i>	Transição branca-opaca	?	43-45
<i>M. oryzae</i>	Conidiação, patogênese		48
<i>B. cinerea</i>	Conidiação, patogênese, metabolismo secundário	?	50
<i>F. oxysporum</i>	Conidiação, patogênese	?	49
<i>H. capsulatum</i>	Transição micélio-levedura	?	37

Esse resumo deixa claro que essas funções, embora diversas, apresentam um viés a favor de mudanças morfogênicas. Porém, é preciso ressaltar que essas mudanças, no tocante aos fenótipos observados, são muito diferentes entre os organismos estudados: não há morfologia comum entre a pseudo-hifa de *S. cerevisiae* e a levedura de *H. capsulatum* ou os conídios de *F. oxysporum*, por exemplo. Isso significa que os genes da família Gti1/Pac2, cuja presença em todo o filo Ascomycota sugere que estavam presentes no ancestral comum de há 500 milhões de anos, foram cooptados evolutivamente para coordenar os mais variados processos.

Em vista disso, entender como esses fatores funcionam ganham importância, uma vez que os membros da família têm em comum o comando de unidades regulatórias vastas, contando centenas de genes, nos organismos em que seu papel foi estudado mais a fundo. Nessa linha de investigação, os grupos de pesquisadores trabalhando em *C. albicans*⁵¹ e *H. capsulatum*⁴⁷ conseguiram

identificar não apenas o sítio de ligação, respectivamente, de Wor1 (TTRRSTTT) e de Ryp1 (TTWRRSTT); como o primeiro grupo identificou um novo domínio de ligação ao DNA que indica que os homólogos de Gti1 e Pac2 integram uma superfamília de fatores de transcrição distinta das 37 superfamílias descritas até hoje. Esse domínio, sempre na porção N-terminal das proteínas, é composto de duas regiões globulares, chamadas WOPRa e WOPRb (Wor1, Pac2, Ryp1). A figura 4 ilustra, em escala, a estrutura das proteínas de diversos fungos.

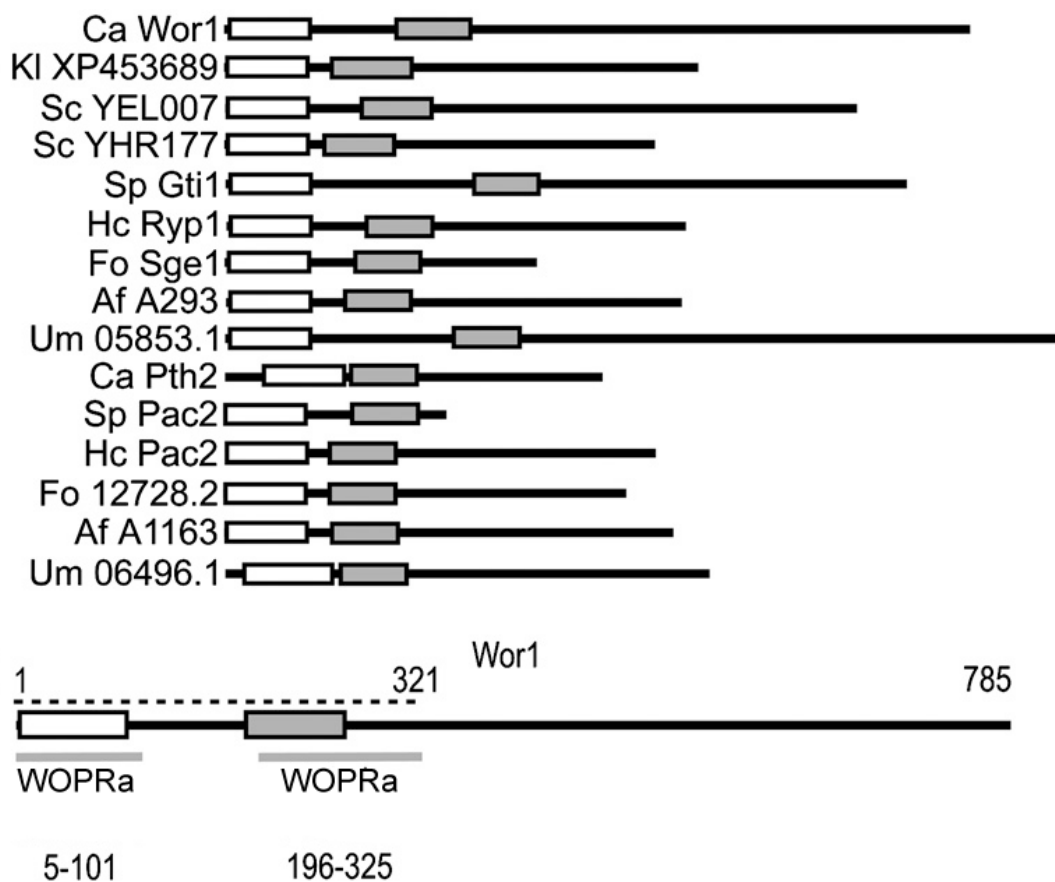


Figura 4. Estrutura, baseada em Wor1, de proteínas da família Gti1/Pac2 de diversos fungos. Ca, *C. albicans*; Kl, *Kluyveromyces lactis*; Sc, *S. cerevisiae*; Sp, *S. pombe*; Hc, *H. capsulatum*; Fo, *F. oxysporum*; Af, *Aspergillus fumigatus*; Um, *Ustilago maydis*, o único basidiomiceto da lista. Os números representam posições de resíduos de aminoácidos na proteína Wor1. Adaptada da referência 51.

Na figura acima, nota-se a primeira inclusão de homólogos de uma espécie de basidiomiceto, *U. maydis*. Isso confirma que os genes já existiam antes da ramificação do sub-reino Dikarya, e possivelmente em todo o reino Fungi. Com

efeito, uma das proteínas de *U. maydis* já teve sua função caracterizada; foi nomeada Pac2 e é essencial para o acasalamento daquela espécie⁵².

Se apenas recentemente os domínios funcionais dessas proteínas começaram a ser elucidados, pouco se sabe sobre suas interações, seja com cofatores, seja com proteínas a montante que lhes transmitam sinalização disparada por estímulos externos.

No primeiro caso, os maiores avanços se deram em *H. capsulatum*, em que recentemente se analisou em detalhe a interação funcional de Ryp1 com as proteínas da família Velvet Ryp2 e Ryp3, e com o fator de transcrição da família Zn(II)₂Cys₆ Ryp4⁴⁷. Cada uma dessas proteínas é necessária para que ocorra o crescimento em forma de levedura e, embora cada uma delas possua um próprio regulon, há grande sobreposição entre eles. No caso de Ryp1, Ryp2 e Ryp3, os autores já elaboraram um modelo funcional para as interações entre eles, que se encontra delineado à figura 5. No entanto, interações físicas diretas de Ryp1 com as demais proteínas não puderam ser investigadas porque, no contexto da técnica usada (hiperexpressão das proteínas em *S. cerevisiae* para estudos de duplo-híbrido), Ryp1 revelou-se tóxica para a levedura hospedeira, uma observação que já fora feita em *F. oxysporum*^{47,49}.

No segundo caso, há poucas informações: em *M. oryzae*, MoGti1 parece precisar da MAPK MoMpk1 para ser endereçada ao núcleo, embora não tenha sido identificada uma interação direta entre as proteínas⁴⁸; em *F. oxysporum*, descobriu-se que um sítio de fosforilação por kinases da família da PKA, conservado em homólogos de outros ascomicetos, é necessário para a função de Sge1, conforme ilustrado à figura 6⁴⁹. Já em *B. cinerea*, os níveis de expressão de Reg1 são reduzidos na presença de mutações nas MAP kinases Sak1 e Bmp3, que são ortólogas de Hog1 e da cinase Slt2 que responde pela integridade de parede celular em *S. cerevisiae*⁵⁰. Em *H. capsulatum*, o fato de que a transição dimórfica depende

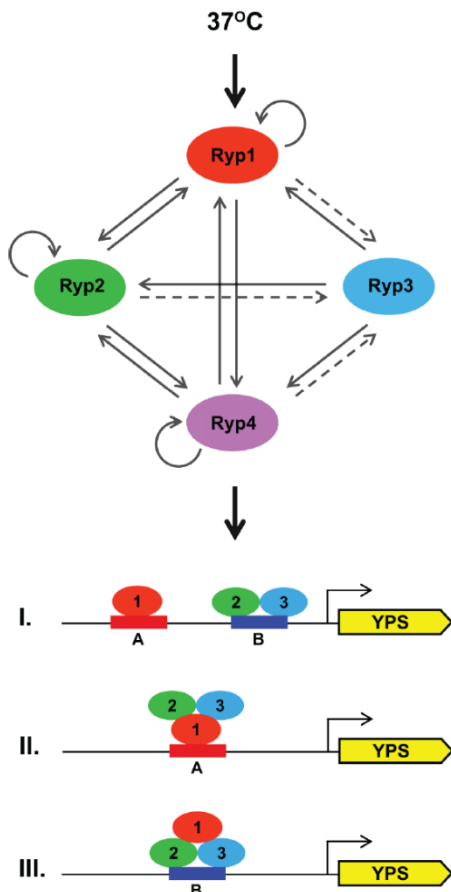


Figura 5. Interações diretas (setas sólidas) confirmadas por estudos de imunoprecipitação de cromatina seguida de microarranjo (ChIP-chip); e indiretas (setas hachuradas) confirmadas por estudos de expressão global em mutantes entre as proteínas Ryp de *H. capsulatum* mediante exposição à temperatura do hospedeiro humano. Numerados I, II e III, os modelos postulados de interação dos fatores Ryp1, Ryp2 e Ryp3 com seus respectivos sítios de ligação no DNA. As interações são parcialmente baseadas em estudos de duplo-híbrido e ChIP. O sítio A foi descrito no texto no contexto da ligação de Ryp1 ao DNA; o sítio B é para a ligação de Ryp2 e Ryp3. YPS é acrônimo para genes específicos da fase de

da cinase bicomponente Drk1⁵³ levou os estudiosos de Ryp1 a postular que esta seria recipiente dos sinais gerados por aquela⁴⁷.

	61	*	▼		120
Sge1 1-120	EHASGIKRWTD SISWSPSRILGNLYLLYRELEKPFPPGEEKRARRGRNGKSTTQSGGITKSR				
Ryp1 1-120	ENASGIKRWTDGVTWSPSRILGNFLVYRELDKPFPPGEEKRAMKKGNRRPTSTG--RPGE				
Wor1 1-120	EQSSGIKRWTDGISWSPSRIQGRFLVYGELIKKNLIDKDKKKKKRKEGPDDEYDHNVNE				
Gti1 1-120	EVQSSGIKRWTDGIAWSPSRVIGNFLVYRQLCKKNSVSDRKRSSKSRSDSDEEEVSAFTVS				

Figura 6. Um potencial sítio de fosforilação nos homólogos de Gti1 em alguns ascomicetos, tendo por base a proteína Sge1 de *F. oxysporum*. O asterisco indica uma arginina conservada cuja mutação eliminou a funcionalidade de Sge1; a cabeça de seta, a treonina presumivelmente alvo da fosforilação. As caixas são sinais de localização nuclear preditos por bioinformática. A numeração é de Sge1. Adaptada da referência 49.

Dada a importância de proteínas da família – em especial dos homólogos de Gti1 – em ascomicetos em geral, e a constatação de que eles também existem pelo menos um basidiomiceto (*U. maydis*), apresenta-se a questão: há homólogos desses genes no basidiomiceto de importância clínica *C. neoformans* e, caso haja, eles desempenham funções importantes para a morfogênese e/ou estabelecimento de infecção em metazoários?

Com efeito, *C. neoformans* possui um FT da família Gti1/Pac2 parcialmente descrito. Numa varredura de mutantes de criptococo em busca de genes cuja deleção resultasse em perda da capacidade de colonização pulmonar em modelo de infecção murina, Hiten Madhani e colaboradores descobriram um gene, que eles denominaram *LIV3* (“infectividade pulmonar”), e cuja perda resultava no fenótipo procurado³⁸. Posteriormente, o mesmo grupo anunciou que a proteína Liv3 estaria implicada num mecanismo de sensoriamento de quórum até então não descrito para *C. neoformans*⁵⁴.

Sabendo da importância de FTs dessa família na virulência e morfogênese de outros fungos, decidiu-se caracterizar o gene com homologia a Gti1 de *C. neoformans*. O homólogo de Gti1 nessa espécie foi identificado e, após caracterização, nomeado Mlc1 (“controlador do *locus MAT 1*”).

Justificativa

Conforme descrito acima, há uma chance grande de que fatores Gti1/Pac2 sejam a desembocadura de uma via de sinalização nova, ou pouco estudada, em *C. neoformans* e outros fungos. Portanto, do ponto de vista prático, a unidade reguladora de Mlc1 a jusante pode revelar genes importantes para o estabelecimento da infecção, incluindo proteínas candidatas a novas estratégias terapêuticas, de que carecemos fortemente dada a limitada gama de antifúngicos existentes e seu desempenho francamente insatisfatório.

Objetivos

O *objetivo geral* deste trabalho foi caracterizar o papel do homólogo de Gti1 em *C. neoformans* na regulação morfogênica e na virulência desse patógeno.

Os *objetivos específicos* foram:

- i. Identificar, no genoma da cepa H99, ORFs de proteínas da família Gti1/Pac2.
- ii. Criar cepas mutantes e reconstituídas para a ORF cuja proteína apresente maior similaridade com proteínas do ramo da família a que pertence Pac2.
- iii. Caracterizar o fenótipo das cepas mutantes e definir se a proteína está envolvida em processos de interesse, tais como acasalamento e virulência
- iv. Usar dados de transcriptoma para definir genes regulados pela proteína e correlacionar os achados com dados de fenótipo.

Metodologia

Considerações gerais

Todos os oligonucleotídios, devidamente identificados quanto à função, têm suas seqüências mostradas na tabela I do apêndice; a terminologia usada para iniciadores de PCR é a sigla LF (Larissa Fernandes) seguida de um número de três dígitos. No mesmo apêndice, encontram-se as composições dos meios e soluções complexas usados, à exceção daqueles adquiridos prontos dos fabricantes de sistemas de biologia molecular, para os quais se refere o leitor aos respectivos manuais. Estoques de DNA são a -20 °C e de RNA, a -80 °C. As soluções simples (um soluto apenas) são aquosas exceto menção em contrário e não estão descritas no apêndice e, sim, no texto. As centrifugações são à temperatura ambiente salvo menção em contrário e tanto elas como as ressuspensões são sempre em tubos de polipropileno adequados ao tamanho da amostra. Todas as centrifugações de *C. neoformans* são à temperatura ambiente, por cinco minutos, a 1000 g salvo menção em contrário. A água sempre é deionizada em grau analítico. Ressuspensões são sempre por repipetagem. Todas as eletroforeses de DNA, salvo menção em

contrário, são em gel de agarose a 1% (m/v), tampão TBE 0,5X, corado com brometo de etídio a 0,5 µg/mL; o campo elétrico aplicado é de cinco volts por centímetro. Nos experimentos com RNA, materiais cerâmicos e vítreos foram tornados livres de ribonuclease (RNase) por incubação a 180 °C por uma noite; tubos e reagentes líquidos já foram fornecidos pelo fabricante livres de RNase; soluções aquosas e material de eletroforese, pela incubação prévia na presença de dietil-pirocarbonato (DEPC) à concentração de 0,1 % (v/v) por uma hora; a água foi produzida pela unidade de filtração deionizante (Human Power I+ Water Purification System, Barnstead Corporation) já livre de RNase, e foi coletada em tubo igualmente livre. Endonucleases de restrição, seus respectivos tampões de reação em soluções estoques concentradas dez vezes (NEBn 10X) e a albumina sérica bovina concentrada cem vezes (BSA 100X) usada com algumas delas foram fornecidos pela empresa New England Biolabs. Excetuando menção em contrário, soluções estocadas ou adquiridas em forma concentrada (nX) têm sempre concentração de uso 1X.

Cepas de micro-organismos e protocolos de cultura vegetativa

E. coli: para as clonagens por choque térmico, usou-se a cepa HST08, fornecida já competente pelo fabricante (Clontech). As culturas para extração de plasmídios foram feitas em meio de lisogenia (meio L), a 37 °C, por 16 horas sob agitação de 250 rpm.

C. neoformans: as cepas selvagens usadas foram H99, KN99a e KN99 α , gentilmente fornecidas pelo professor Andrew Alspaugh da Universidade Duke, Estados Unidos. O meio de cultura para crescimento vegetativo foi o YPD a 30 °C, líquido, por 24 horas. Culturas em meio sólido foram feitas em YPD, à mesma temperatura. Colônias de uma placa de estoque foram usadas por até duas semanas, sem repiques, e depois descartadas em favor de culturas frescas a partir de tubos de criopreservação.

Macrófagos

Para os experimentos de fagocitose e sucesso de macrófagos em restringir a proliferação intracelular de *C. neoformans*, foi usada a linhagem celular peritoneal murina J774.A1. As células foram mantidas no meio 1640 do Instituto Memorial do Parque Roswell (RPMI 1640) suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% (v/v), a 37 °C em câmara de incubação abastecida de CO₂ a 5%. Células eram repicadas quando a confluência atingia 90%, e descartadas antes da décima passagem após o descongelamento.

Lepidópteros

Para os experimentos de infecção em modelo animal alternativo, obtiveram-se larvas de último instar da mariposa da cera, *G. mellonella*, junto à Dra. Patrícia de Andrade Nicola (Universidade de Brasília, *campus* de Ceilândia).

Transformação de *C. neoformans* por biobalística

Em todos os casos, geraram-se culturas de *C. neoformans* da seguinte maneira⁵⁵: uma colônia jovem e grande (5 mm ou mais) da cepa a ser transformada foi inoculada em 100 mL de YPD líquido, e o conjunto foi incubado por 24 horas a 30 °C 150-200 rpm em frascos de 250 mL. O sistema foi dividido em alíquotas de 50 mL em tubos de polipropileno estéreis com tampa, e as células foram precipitadas por centrifugação num rotor basculante. O meio de cultura foi descartado e o conteúdo de cada tubo, ressuspendido em 50 mL de NaCl estéril a 0,9% (salina) ou água. O material foi centrifugado novamente nas mesmas condições e os precipitados foram ressuspendidos em um volume de salina suficiente para permitir a distribuição no número necessário de placas de transformação (duas ou três para cada 100ml de cultura original). A suspensão de leveduras foi então reunida num mesmo tubo e dividida igualmente em placas de transformação, (YPD ágar suplementado com sorbitol a 1M), feitas na mesma

semana, com diâmetro de 90 mm e 30-35 mL de ágar por placa). A suspensão foi espalhada na superfície de cada placa e as placas foram deixadas abertas no fluxo laminar estéril por no mínimo 2 horas.

O DNA para transformação consistia de 1-2 µg de DNA do cassete de deleção (resistência à higromicina pelo gene HPH, higromicina fosfotransferase, oriundo do vetor pPZP-Hyg2⁵⁶), ou de quantidades de cassete de reconstituição e do plasmídeo pJAF1⁵⁷ (resistência ao G418 pelo gene neomicina fosfotransferase, NEO) na proporção molar de 3:1. As suspensões de DNA em água tiveram seu volume ajustado para menos de cinco microlitros por secagem a vácuo (SPD2010 P1 Vacuum concentrator, Thermo Fisher Scientific, sem aquecimento) e foram mantidas em tubos polipropileno de 1,5 mL. Paralelamente, partículas de tungstênio M10 (0,7µm, Biorad) previamente esterilizadas foram pré-preparadas para acomodar o DNA: inicialmente, os aglomerados de partículas em suspensão foram desfeitos por incubação em banho sonicador (sete minutos), e depois a suspensão foi tornada homogênea por agitação em vórtice mecânico à velocidade máxima por dois minutos. Em seguida, 50 µL de partículas foram adicionados à solução de DNA, imediatamente seguidos, nesta ordem, por 20 µL de solução de espermidina a 100 mM descongelada apenas uma vez e 50 µL de CaCl₂ a 2,5 M. A suspensão resultante foi homogeneizada por agitação em vórtice mecânico a baixa velocidade por dez minutos, no mínimo.

As suspensões de partículas conjugadas com DNA foram então centrifugadas à velocidade máxima em centrífuga de microtubos por dez segundos. A solução foi removida cuidadosamente e as partículas foram lavadas, em fluxo laminar, pela adição de 150 µL de etanol absoluto seguida de homogeneização pelo impacto múltiplo do tubo contra uma superfície irregular. A suspensão foi então centrifugada novamente nas mesmas condições, o etanol foi removido, e duas novas lavagens com etanol idênticas à primeira foram feitas, a última seguida de

ressuspensão num volume de etanol absoluto *suficiente para até seis alíquotas de quatro microlitros*, de acordo com o número de transformações necessárias.

As alíquotas foram então distribuídas em membranas carreadoras inseridas em discos carreadores para biobalística, segundo as instruções do fabricante (Bio-Rad). Os discos carreadores preparados com as partículas contendo DNA foram secados em recipiente com sílica-gel por pelo menos meia hora e, em seguida, a transformação das placas de levedura seguiu as instruções do fabricante. Após a transformação, cada placa foi incubada por 48 horas a 30 °C e então o tapete de leveduras foi removido com múltiplas lavagens em água estéril e transferido para placas de 150 mm contendo YPD ágar acrescido do antifúngico do cassete de resistência usado (higromicina para deleção, neomicina para reconstituições, ambas a 200 µg/mL), na proporção de uma placa para cada placa de transformação. Aguardou-se então o surgimento de colônias resistentes num espaço de quatro a sete dias. As colônias foram então transferidas para placas contendo o mesmo ágar seletivo, com vagas numeradas para classificação dos transformantes, e nessa etapa foram feitos controles negativos e positivos com cepas parentais ou transformadas com o mesmo gene de resistência para confirmar a eficácia da seleção. As colônias da placa de classificação foram usadas para a extração de DNA genômico.

Extração de DNA genômico de *C. neoformans*

*Protocolo de pequena escala*⁵⁸ – em cada caso, uma cultura de 24 horas de *C. neoformans* em YPD líquido foi gerada pela sementeira de uma colônia pequena (1 mm ou menos, ou um fragmento de colônia) num volume de cinco mililitros em um tubo de polipropileno estéril com tampa e o sistema foi incubado a 30 °C sob agitação de 150-200 rpm. O meio de cultura foi removido das células por centrifugação, elas foram ressuspensas em 1,5 mL água estéril e a suspensão foi transferida para tubos de polipropileno de 2 mL. A água foi removida por

centrifugação e ao precipitado de células adicionaram-se aproximadamente 250 µL de pérolas de vidro tratadas com ácido (Sigma-Aldrich, diâmetro médio de 0,45 mm), 500 µL de fenol:clorofórmio:isopentanol 25:24:1 (BioAgency) e 500 µL de tampão TENTS. Os sistemas foram agitados à velocidade máxima em vórtice mecânico por dez minutos para romper as células, a que se seguiu centrifugação a 17.000 g à temperatura ambiente por dez minutos. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida por pipetagem (ponteiras de 200 µL) para um novo tubo de 2 mL e a ela se acrescentaram 50 µL de acetato de sódio três molar e um mililitro de etanol absoluto. Agitou-se o sistema vigorosamente para homogeneizá-lo e procedeu-se à precipitação do DNA genômico por centrifugação a 17.000 g por quinze minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado pela aplicação de 200 µL de etanol 70%, seguida de agitação e nova centrifugação semelhante à anterior, mas por apenas cinco minutos. O etanol foi descartado por pipetagem e o precipitado, secado por cinco minutos sob fluxo laminar antes de ser ressuspenso em 100 µL de água contendo RNase A (um microlitro, Roche Applied Science). A amostra foi incubada a 37 °C por uma hora para solubilizar completamente o DNA e eliminar qualquer contaminante de RNA, e então estocada. Este DNA é apropriado para PCR e, por vezes, para hibridação em membrana, a depender da qualidade eletroforética e do rendimento.

*Protocolo de larga escala*⁵⁹ – em cada caso uma cultura de 100 mL de criptococo em YPD nas mesmas condições usadas para biobalística. O meio de cultura foi removido das células por centrifugação. O precipitado celular foi afrouxado por impacto até que se distribísse o mais amplamente possível no fundo do tubo, que foi então congelado a -80 °C por uma hora dentro de um frasco de liofilização. O conjunto então foi liofilizado por pelo menos oito horas, e então cuidadosamente aberto em cabine de biossegurança para evitar a dispersão do fungo liofilizado. Acrescentaram-se à massa seca de fungos de três a cinco mililitros de esferas de vidro de três milímetros de diâmetro, tratados com ácido. O tubo foi

fechado e o sistema, agitado vigorosamente em vórtice mecânico até que o fungo se reduzisse a um pó fino. Adicionaram-se, então, dez mililitros de tampão CTAB. Misturou-se gentilmente o tubo por inversão até que a suspensão tivesse aspecto uniforme e viscoso. O tubo foi então incubado por uma hora a 65 °C e resfriado sob água corrente. Adicionou-se então igual volume de clorofórmio e misturou-se o sistema gentilmente por inversão por um minuto. O tubo foi então centrifugado a 10.000 g por dez minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e acrescida de igual volume de isopropanol. Misturou-se gentilmente e repetiu-se a centrifugação anterior. Descartou-se o sobrenadante e se enxaguou brevemente o precipitado de DNA com etanol a 70%. Ressuspendeu-se o material em 500 µL de TE contendo dois microlitros de RNase A (Roche Applied Science) e incubou-se o sistema por uma hora a 37 °C para dissolver o precipitado e eliminar traços de RNA contaminante. Verificou-se a integridade do DNA por eletroforese e sua concentração, por espectrofotometria. A solução foi aliqüotada e estocada. Este procedimento rotineiramente gera centenas de microgramas de DNA de alta qualidade e grau de pureza, apropriado para qualquer tipo de experimento.

Sistemas comerciais de baixa complexidade

Nos seguintes casos, protocolos de fornecedores foram seguidos à risca sem modificações e, como se trata de sistemas e procedimentos elementares, eles não serão descritos em detalhe e o leitor é referido para os respectivos manuais.

Extração de DNA plasmidial: bactérias transformadas foram extraídas pelo sistema illustra® PlasmidPrep Mini Spin (GE Life Sciences) e eluídos em água para estocagem.

Extração de bandas de DNA a partir de géis de agarose ou reações enzimáticas: bandas recortadas a partir de géis foram purificadas pelo sistema illustra® GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Life Sciences) e eluídas em água para estocagem.

Produção dos cassetes de deleção e reconstituição do gene *MLC1* por PCR

Os números associados aos amplicons de deleção correspondem ao esquema geral apresentado no artigo que introduziu a técnica de PCR de sobreposição para nocaute gênico em *C. neoformans*⁶⁰.

Usou-se o seguinte esquema de amplificação:

- i. No caso do cassete de deleção *MLC1::HPH*, 20 ng do fragmento 4/6 (≈ 700 pb) e proporções equimolares dos fragmentos 2/5 ($\approx 2,3$ kpb) e 1/3 (≈ 800 pb).
- ii. No caso do cassete de reconstituição, 20 ng de DNA genômico de H99.
- iii. 1,5 unidade de Fidelity[®] DNA Polimerase (Thermo Fisher Scientific).
- iv. Iniciadores LF001 e LF006 a $0,2 \mu\text{M}$ cada.
- v. MgCl_2 a 2 mM
- vi. Reação de 50 μL por tubo, quatro tubos ao todo.
- vii. Programa:
 - 95 °C por um minuto
 - 95 °C por 30 segundos
 - 56 °C por 30 segundos
 - 72 °C por dois minutos } 45 vezes
- 72 °C por dez minutos
- Preservação a quatro graus

No caso do cassete de reconstituição, o tempo de extensão usado foi de quatro minutos.

Confirmação de deleção ou reconstituição do *locus MLC1* por hibridação em membrana de DNA

Para testar, em cepas cujo status do *locus MLC1* foi confirmado por PCR, se ele se encontra mesmo íntegro e sem rearranjos mais sutis que escapem ao primeiro método, usou-se o método de Southern de imobilização de DNA em membrana seguido de hibridação com sonda. O sistema usado foi o de marcação de sonda com digoxigenina seguida de sua detecção com anticorpo. Os reagentes não descritos no apêndice e os protocolos são do fornecedor, com modificações descritas abaixo (Roche Applied Science).

Enzimas de restrição para tratar o DNA genômico: NcoI e PvuII, usadas na proporção de duas unidades por micrograma de DNA.

Quantidade de DNA digerido: vinte microgramas, para usar dez em cada poço do gel para transferência.

Método de marcação da sonda por PCR:

i. Sonda: amplicon da região 5' do *locus MLC1*, gerado com o sistema abaixo:

- Um microlitro de uma diluição 1:500 do DNA genômico de H99 (estoque)
- Iniciadores LF001 e LF018 a 0,2 µM cada
- 1,5 unidade de Fidelity DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific)
- Um microlitro de solução de dNTPs do sistema DIG (Roche)
- Um microlitro de solução contendo DIG-UTP (Roche)
- Tampão e água para vinte microlitros

ii. Programa de PCR:

- Um minuto a 95 °C
 - 30 segundos a 95 °C
 - 30 segundos a 56 °C
 - Um minuto a 72 °C
- } 45 vezes
- Cinco minutos a 72 °C

- Preservar a quatro graus

Confirmação da marcação da sonda por eletroforese: à figura 7

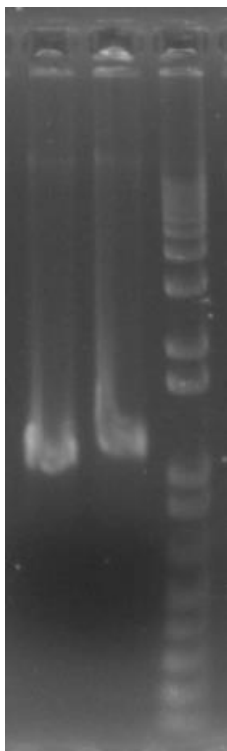


Figura 7. Sonda *MLC1* para hibridação em membrana, marcada com digoxigenina por PCR. Foram aplicados cinco microlitros – no primeiro poço, de um controle negativo gerado na ausência de DIG-UTP, e em que se vê a banda esperada de 1.023 pb; no segundo, da sonda propriamente dita. Confirma-se o pequeno retardo eletroforético provocado pelos grupos DIG incorporados. A sonda é apropriada para a hibridação. O marcador são 500 ng do 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). A seta indica a banda de 1 kb.

Transferência do DNA separado por eletroforese para a membrana: o gel de agarose contendo as amostras digeridas, o marcador de peso molecular e a sonda (controle positivo) foi submetido a eletroforese a 2 V/cm até que o corante inferior (azul de bromofenol) do tampão de aplicação das amostras tivesse migrado pelo menos dois centímetros. O gel foi então fotografado na presença de uma régua e processado para transferência por meio da imersão nas seguintes soluções: dez minutos em solução depurinadora (HCl a 125 mM), trinta minutos em solução desnaturadora e mais trinta em solução neutralizadora. Montou-se o sistema pelo método de transferência capilar ascendente, tendo o SSC 20X como solução de transferência. A membrana usada foi de poliamida alifática positivamente carregada (HyBond® N+, Ge Life Sciences).

Pré-processamento da membrana: o sistema de transferência foi desmontado, a membrana foi fixada em câmara de UV usando o ciclo otimizado do aparelho (Stratalinker, Agilent), acondicionada em garrafas de vidro cilíndricas e, em seguida, pré-hibridada por meia hora a 50 °C em tampão de hibridação num forno giratório.

Preparo da sonda: a quantidade de sonda necessária (determinada pelo volume de tampão de hibridação, de acordo com o manual do fornecedor) foi fervida por dez minutos em um tubo de polipropileno e rapidamente colocada no gelo para impedir a reassociação das fitas de DNA.

Processamento da membrana: a sonda foi acrescentada ao tampão de hibridação e incubada com a membrana por uma noite a 50 °C.

Lavagens, incubação com anticorpo, geração do sinal e revelação: conforme o manual, apenas com a modificação de que todas foram feitas à temperatura ambiente. A detecção foi feita em (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) por dez minutos, e a revelação foi feita com soluções reveladora e fixadora fornecidas pela Kodak Corporation.

Em um caso de deleção (vide resultados) usou-se um sistema de hibridação em membrana diferente (AlkPhos®, GE Healthcare), seguindo-se as instruções do fornecedor.

Fenótipos de crescimento *in vitro* que derivam da expressão de fatores de virulência ou de resistência a estresse de *C. neoformans*

Para testar quaisquer dos atributos de patogenicidade do fungo, as cepas a serem analisadas foram primeiro semeadas a partir de colônias jovens em meio YPD, e incubadas nas mesmas condições do protocolo de extração de DNA genômico em pequena escala. O meio de cultura foi removido por centrifugação e o precipitado de leveduras foi ressuspenso em um mililitro de salina antes de ser transferido para um tubo de polipropileno estéril de 1,5 mL. A salina foi removida

por centrifugação e as células, ressuspensas em nova alíquota de salina. A densidade celular foi estimada por contagem em hematocitômetro e prepararam-se seis diluições seriadas com fator de dez, sendo a primeira à concentração de 10^7 células por mililitro, em salina. Cada ponto de aplicação correspondeu a 10 μ L da diluição correspondente (ou cinco, no caso do meio contendo SDS). Nos testes qualitativos, em que se aplica apenas uma quantidade conhecida de fungo à placa de fenótipo, usou-se a diluição mais conveniente, conforme descrito nos casos específicos abaixo.

Estresse de parede: usou-se Vermelho Congo a 1% em YPD a 37 °C.

Estresse osmótico: usaram-se NaCl e KCl, separadamente, cada um a 1,5 M em YPD a 30 °C.

Estresse oxidativo: usou-se H₂O₂ milimolar em YPD a 30 °C.

As medições de estresse foram todas por diluição seriada.

Produção de melanina: usou-se meio ágar/L-DOPA a 30 °C.

Produção de urease: usou-se ágar de uréia de Christensen a 30 °C.

Produção de fosfolipase B1: usou-se ágar/gema de ovo a 30 °C.

As provas de produção foram por aplicação de alíquota fúngica única.

Produção de cápsula e formação de grumos: um milhão de células fúngicas foram ressuspensas em um mililitro de Sabouraud ácido diluído em MOPS⁶¹, e incubadas sem agitação a 37 °C no escuro, por até sete dias. Para verificar se os grumos eram provocados por atração eletrostática entre as células, ou se por defeito de citocinese, uma alíquota de 50 microlitros das culturas foi sonicada (Q700 sonicator, QSonica Inc., equipado com um pedestal de sonicação, à amplitude máxima, em intervalos de vinte segundos), após o que foram observadas à microscopia de campo claro.

Curvas de crescimento fúngico

Para avaliar a capacidade de crescimento em meio líquido, cada cepa foi diluída em meio de cultura à concentração inicial de 10^4 células/mL e alíquotas de 100 µl da suspensão resultante foram aplicadas em triplicata numa placa de cultura de 96 poços. Esta foi então submetida à incubação sob agitação (500 rpm, dupla orbital) em um leitor motorizado de placas (modelo EON, Biotek Inc.). A densidade óptica da cultura foi medida a cada 30 minutos. Os meios usados foram YPD e o meio CO₂-independente³⁶ (CIM) e as temperaturas, 30 °C ou 37 °C.

Acasalamento

Foram preparadas placas Petri descartáveis de 90 mm de diâmetro com meio sólido sintético com glicose e baixa concentração de amônio (ágar SLAD). Leveduras de tipos sexuaisopostos foram obtidas de culturas jovens em YPD (como para os testes de fenótipo do item 2.10) e misturadas em água na proporção 1:1, mil leveduras de cada, num volume final de dez microlitros. Esse volume foi então aplicado na superfície do ágar. Para que não houvesse diferenças locais de umidade, os diversos acasalamentos foram aplicados de forma equidistante do centro da placa. Cada acasalamento foi feito em três placas independentes. As placas aplicadas foram deixadas no gabinete de biossegurança até que toda a água evaporasse e então estocadas à temperatura ambiente no escuro por três semanas. Fotos da colônia e dos filamentos diplóides foram tiradas, respectivamente, por lupa estereoscópica e microscópio de luz de campo claro diariamente.

Ensaio de atividade fungicida de macrófagos em cultura⁶²

Primeiro dia:

- i. A partir de uma cultura saudável de macrófagos J774.A1 (não confluentes, número de passagem inferior a dez), descolaram-se as células da garrafa com rodo estéril ou solução de descolamento (Sigma-Aldrich, Cell Stripping Solution; cobriram-se as células com uma lâmina

- fina de líquido e incubar a 37 °C por 30-40 minutos antes de serem descoladas com um jato de líquido pela pipeta) e centrifugou-se a suspensão de células a 200 g por cinco minutos à temperatura ambiente.
- ii. Descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se os macrófagos em um mililitro de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Thermo Fisher Scientific) suplementado por SFB a 10%.
 - iii. Diluiu-se uma alíquota de macrófagos 1:10 em PBS contendo azul de tripano (estoque: 10X). Contaram-se as células não-coradas imediatamente num hematocítômetro.
 - iv. Ajustou-se a concentração dos macrófagos para $2,5 \times 10^5$ células/mL com DMEM+SFB10% contendo ampicilina a 50 µg/mL (estoque: 50 mg/mL, 1000X) e estreptomicina a 100 µg/mL (estoque: 500 mg/mL, 5000X). Preparou-se volume suficiente de suspensão para o número de poços que se pretende usar, com uma sobra para incluir o erro de pipetagem.
 - v. Numa placa de 96 poços (estéril, fundo chato, com tampa, tratada para cultura de tecidos), aplicaram-se 100 µL por poço. Preferiu-se usar os poços centrais, para minimizar variações de volume por evaporação durante o experimento. Fizeram-se três replicatas para cada condição e cepa, mais três poços de controle negativo (que não receberam criptococos). Fez-se uma segunda placa idêntica à primeira para a medição do índice fagocítico.
 - vi. Incubou-se a placa por uma noite a 37 °C e CO₂ a 5%.
 - vii. Inocularam-se tubos de meio de cultura de criptococo com as cepas de interesse e eles foram postos para incubar nas condições de interesse (para um experimento simples, YPD a 30 °C por uma noite).

Segundo dia:

- viii. Inspeccionou-se a placa de cultura. As células estavam vivas, espalhadas, não confluentes, e sem grumos. Espaços vazios eram visíveis, mas não predominantes.
- ix. Centrifugou-se a cultura fúngica (1000 g, cinco minutos, temperatura ambiente), descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em um mililitro de salina tamponada com fosfato (PBS). As células fúngicas foram transferidas para tubos de microcentrífuga. Repetiu-se a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células novamente em igual volume de PBS.
- x. Preparou-se uma diluição 1:40 a 1:100 das leveduras e estimou-se a densidade celular num hematocítmetro. Nessa etapa, pode-se usar a floxina B para contar apenas as viáveis.
- xi. Diluíram-se os criptococos para uma concentração de $2,5 \times 10^6$ células/mL em meio DMEM+SFB10% contendo antibióticos e o anticorpo anti-GXM 18B7⁶³ (fornecido por A. Casadevall) a uma concentração de 10 µg/mL (estoque: 1,9 mg/mL, 190X). Misturou-se bem (vórtice ou repipetagem) e usou-se a suspensão imediatamente. *Nota:* pode-se fazer uma solução contendo DMEM suplementado e o anticorpo, e usá-la para diluir o fungo, mas lembre-se de fazer um excesso que permita trocar o meio dos controles negativos.
- xii. Encostando a ponteira inclinada no canto de cada poço, retirou-se o meio velho das culturas de macrófagos. Aspirou-se o meio com suavidade para não incomodar o tapete de células.
- xiii. Aplicou-se 100 µL da suspensão de fungos opsonizados em DMEM em cada poço contendo células. Isso corresponde a aplicar $2,5 \times 10^5$ células por poço, ou aproximadamente cinco leveduras por macrófago, uma concentração que foi bem-sucedida em nossas mãos. Isso foi feito para as duas placas.

- xiv. Centrifugou-se as placas de células a 200 g por cinco minutos à temperatura ambiente para forçar o contato do fungo com os macrófagos.
- xv. Incubou-se o sistema na estufa de cultura de células por entre uma e duas horas.
- xvi. Retirou-se, com os mesmos cuidados do passo (xii), o meio contendo fungos não fagocitados das duas placas. Aplicou-se PBS naquela que foi usada para índice fagocítico (100 µL por poço bastam) e estafoi posta à parte.
- xvii. Adicionou-se DMEM/SFB 10% fresco aos poços da outra placa.
- xviii. Retornou-se a placa com DMEM para a estufa de incubação e deixou-se mais uma noite.
- xix. Adicionou-se solução fixadora à placa de índice fagocítico de acordo com o protocolo correspondente (se metanol gelado, por exemplo, deixar meia hora no refrigerador a quatro graus) e em seguida, prosseguiu-se com a coloração de Giemsa.
- xx. Prepararam-se placas tripartites de meio YPD sólido. Cada partição correspondeu a uma replicata experimental de cada condição testada no experimento [vide passo (v)].

Terceiro dia e além:

- xxi. Inspeccionou-se a placa para ver se não havia contaminação ou outro problema e, com os cuidados do passo (xii), removeu-se o meio de cultura das células, que foi transferido para um tubo de microcentrífuga estéril (um tubo para cada replicata).
- xxii. Lisaram-se os macrófagos aplicando 100 µL de uma solução de SDS 0,1% em água. Pipetou-se para cima e para baixo com vigor algumas vezes e recolheu-se a suspensão no mesmo tubo de microcentrífuga. Misturou-se bem (vórtex) o conteúdo de cada tubo.

- xxiii. Diluiu-se a suspensão de lisado contendo leveduras para semear na placa. Os resultados mais consistentes foram obtidos diluindo-se 100 vezes em duas séries de 100 μ L/900 μ L de salina estéril, e aplicando-se 100 μ L da última diluição por partição de placa de YPD. Guardou-se o restante das diluições na geladeira até o dia seguinte.
- xxiv. Entre o quarto e o quinto dia, observaram-se as placas de fungos fagocitados, contaram-se as colônias de cada replicata e calculou-se a taxa de sobrevivência das cepas no interior dos macrófagos. Nas placas de índice fagocítico, este foi calculado fotografando-se campos aleatórios, contando-se todas as células, todos os fungos fagocitados, dividindo-se o primeiro número pelo segundo e combinando-se os campos de uma mesma amostra para obter uma mediana equivalente a pelo menos 50 células de macrófago.

Ensaio de virulência fúngica em *G. mellonella*²⁸

- i. Obteve-se uma cultura fúngica jovem de criptococo da mesma forma que para macrófagos, lavou-se do mesmo jeito com PBS e ressuspendeu-se para uma concentração final de 10^6 leveduras por mililitro em PBS contendo ampicilina a 400 μ g/mL.
- ii. Separaram-se as larvas em placas de Petri limpas, de vidro, com 90 mm de diâmetro, sem alimento ou água, em grupos de, no mínimo, 16 indivíduos.
- iii. Limpou-se cada larva com um papel absorvente embebido em etanol e injetaram-se, na altura da última pró-pata e com uma seringa Hamilton, dez microlitros da suspensão de fungos. Secou-se o ponto de injeção com um papel absorvente e devolveu-se a larva para a placa Petri.
- iv. Incubaram-se as larvas no escuro a 37 °C. Diariamente, contaram-se as larvas vivas, mortas e empupadas e anotaram-se os números.

Ensaio de virulência em camundongo

Todos os experimentos com camundongos foram pré-aprovados pelos Comitês de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Universidade de Brasília (protocolo 52657/2011) e da Universidade Católica de Brasília (protocolo número 18/14).

Para os estudos de virulência em modelo murino de criptococose, usou-se a linhagem BALB/C, dez animais por grupo. Os animais foram anestesiados e receberam uma injeção intratraqueal de PBS contendo 2×10^5 leveduras, sendo feito ainda um controle apenas com PBS. Em seguida, a incisão cervical foi fechada com adesivo veterinário e os animais foram mantidos em gaiolas com alimentação e água *ad libitum*. Diariamente, foram pesados e avaliados quanto à atividade espontânea e estimulada, bem como à presença de sinais neurológicos e mudanças na aparência. A cada indivíduo foi, então, atribuído um escore de morbidade pela doença, segundo os seguintes critérios^{64,65}:

- a. *Perda de peso*: igual ou menor que 10%, zero ponto; de 10% a 20%, um ponto; maior que 20% e até 25%, dois pontos; superior a 25%, três pontos.
- b. *Comportamento*: normal, zero ponto; redução espontânea de atividade, um ponto; resposta reduzida a estímulos externos, dois pontos; letargia e isolamento do grupo, três pontos.
- c. *Pelagem*: normal, zero ponto; arrepiada, um ponto.
- d. *Sinais neurológicos*: macrocefalia, dois pontos; paralisia de membros inferiores, três pontos.

Animais foram considerados moribundos e sacrificados quando atingiram escore combinado de quatro.

Avaliação da carga fúngica pulmonar e cerebral

Animais infectados (quatro ou cinco por grupo) do mesmo modo que no experimento de sobrevivência foram mantidos por sete dias e então sacrificados. O cérebro e o pulmão direito foram extraídos separadamente, pesados, acrescidos de PBS e macerados. A suspensão de cada órgão foi então diluída serialmente (dez vezes por ponto) e diluições apropriadas foram aplicadas em placas de ágar YPD em triplicata. As placas foram incubadas a 30 °C até o aparecimento de colônias, que foram então contadas e usadas para estimar a carga fúngica, em unidades formadoras de colônia por grama de tecido (UFC/g).

Histopatológico pulmonar

Os pulmões esquerdos dos animais sacrificados no experimento anterior foram inflados com solução de paraformaldeído 1% (m/v) em PBS usando uma seringa de insulina, e então acondicionados em estojos de emblocamento, e então enviados para processamento com coloração de hematoxilina e eosina em cortes histológicos pelo professor Florêncio Figueiredo da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Os cortes histológicos foram então comparados à microscopia de luz.

Medição de cápsula

O fungo foi semeado em meio DMEM/MOPS sólido⁶⁶ e as placas foram incubadas a 37 °C na presença de CO₂ a 5% por 48 horas. Frações da colônia foram então ressuspensas em uma solução de Percoll[®] 50% e observadas à microscopia de contraste de interferência diferencial num microscópio Axio Z1 Observer (Carl Zeiss GmbH) equipado com uma câmera CCD refrigerada (modelo MRm, Carl Zeiss), sob uma objetiva de 40X (EC Plan Neofluar 0,75 Ph2; Carl Zeiss). As fotos foram analisadas no software Zen 2 (Carl Zeiss) e a espessura das

cápsulas de pelo menos 50 células foi medida para comparação entre as cepas. Em alguns experimentos, a cápsula foi detectada para documentação micrográfica pela adição de tinta nanquim à suspensão de células, seguida de microscopia de campo claro.

Detecção de GXM capsular

Células cultivadas em meio indutor de cápsula (Sabouraud ácido diluído em MOPS⁶¹) por 24 horas a 37 °C foram precipitadas por centrifugação e ressuspensas em PBS contendo o anticorpo 2D10⁶³, uma IgM monoclonal anti-GXM, à concentração de 10 µg/mL. A suspensão foi incubada por meia hora a quatro graus, e então as células foram lavadas três vezes, intercaladas por centrifugação, em PBS antes de se adicionar o anticorpo secundário, uma IgG policlonal anti-IgM murina, conjugada ao fluorocromo Alexa Fluor[®] 488 (Thermo FisherScientific), a uma concentração de um micrograma por mililitro. Seguiu-se nova incubação de meia hora a quatro graus e nova lavagem com PBS. As células foram observadas à microscopia de campo claro e fluorescência no mesmo microscópio descrito acima. A objetiva usada foi de 63X para óleo de imersão (Plan-Apochromatic 1.4/DIC; Carl Zeiss).

Dosagem de GXM secretada por ELISA⁶⁷

Leveduras foram semeadas em 50 mL de meio mínimo (MM) à densidade inicial de 10⁶ células/mL. Os frascos cônicos de cultura foram então incubados a 37 °C e 150 rpm por 120 horas. Alíquotas da cultura foram colhidas a cada 24 horas, as células foram removidas por centrifugação e o sobrenadante foi processado para ELISA de acordo com a referência. As opsoninas foram 2D10 para captura e a IgG monoclonal 18B7⁶³ para detecção.

Extração de RNA total de *C. neoformans* e seqüenciamento de RNA

Para determinar se há diferenças de quantidade de transcritos entre a cepa parental H99 e o mutante *mlc1*, foi necessário primeiro escolher a condição em que essas diferenças seriam avaliadas. Optou-se por CIM a 37 °C por quatro horas: como se verá na seção de resultados, nessa condição a maior parte dos fenótipos *in vitro* do mutante se manifesta, e por este motivo ela foi escolhida.

As amostras foram geradas da seguinte maneira: a partir de culturas de 12 horas em YPD (50 mL), o fungo foi centrifugado e ressuspenso em PBS no gelo. A densidade de leveduras na suspensão foi contada em hematocitômetro e semeada em frascos cônicos de 250 mL contendo 50 mL de CIM pré-aquecido, a uma densidade de 9×10^6 células/mL. Os frascos foram então submetidos à agitação de 150 rpm pelo período de tempo determinado. As culturas foram então colocadas em banho de gelo e água e resfriadas por cinco minutos, e a seguir o fungo foi precipitado por centrifugação a quatro graus. O meio de cultura foi removido e as leveduras foram congeladas instantaneamente pela imersão em banho de gelo seco e etanol. A massa fúngica foi então liofilizada por duas horas. Foram adicionadas pérolas de vidro (0,45 cm de diâmetro) às amostras e estas foram então agitadas à velocidade máxima em vórtice mecânico até se converterem em pó fino. Nesse momento, adicionaram-se 600 µl do tampão RLT do sistema RNEasy® de extração de RNA de Planta (QIAGEN Inc) e o restante da extração seguiu as instruções do fabricante.

O RNA total foi quantificado por espectrofotometria e teve sua integridade pré-avaliada por eletroforese antes de ser enviado (cinco microgramas por amostra) para seqüenciamento pela técnica de fluorocromos terminais (Illumina Inc) no Centro de Biologia Computacional e Genômica da Universidade Duke (EUA), onde ele foi avaliado por passagem em bioanalisador capilar (Agilent Bioanalyser; todas as amostras tiveram número de integridade de RNA – RIN – acima de 7,7) e teve os RNAs mensageiros purificados por extração de RNA poli-A+ (KAPA Stranded mRNA-Seq Kit, Kapa Biosystems).

O seqüenciamento propriamente dito foi feito numa máquina HiSeq 2000 (Illumina Inc), e o protocolo escolhido foi de 50 bases em extremidade única. O experimento foi feito em duplicata.

Bioinformática

Os dados brutos de seqüência foram processados pela suíte de programas TopHat2/Cufflinks/CuffDiff^{68,69} usando parâmetros padrões. O genoma e o transcriptoma de referência são provenientes do bando de dados do Instituto Broad de MIT e Harvard. A análise de ontologia gênica foi feita pelo programa Blast2GO⁷⁰ e os arquivos FASTQ com os dados originais foram depositados no Arquivo de Leituras de Seqüência (SRA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/>) sob o número de acesso SRP067741.

PCR em tempo real

Tanto para validar transcritos diferenciais do RNA-Seq, como para dosagem de transcritos de interesse em outros experimentos, dois microgramas do RNA em questão foram submetidos à transcrição reversa pelo sistema High Capacity segundo instruções do fornecedor. A PCR em tempo real foi feita com o sistema Fast SYBR Green Master Mix num termociclador modelo 7500 Fast. O aparelho e os reagentes foram fornecidos pela Thermo Fisher Scientific. O transcrito normalizador foi do gene *ACT1* (cadeia leve da beta-actina), e o controle é a cepa parental nas mesmas condições.

Citocalização da proteína Mlc1

Para determinar se a proteína Mlc1 é nuclear, foi construída uma quimera Mlc1-GFP. Para isso, a seqüência codante de *MLC1*, gerada por RT-PCR a partir de cDNA do fungo, foi clonada no plasmídio pCN50, que contém o gene da proteína fluorescente verde⁷¹. A RT-PCR foi feita nas seguintes condições:

- i. Dois microlitros de cDNA (item 2.23);
- ii. Iniciadores LF353 e LF354 a 0,5 μ M cada;
- iii. dNTPs a 200 μ M;
- iv. 1,25 unidades de One Taq Hot Start[®] DNA Polimerase (New England Biolabs)
- v. Volume final de 50 μ l contendo tampão para a enzima, fornecido pelo fabricante.
- vi. Programa de PCR:
 - i. 30 s a 94 °C
 - ii. 15 s a 94 °C
 - iii. 30 s a 58 °C
 - iv. Dois minutos a 68 °C
 - v. 15 s a 94 °C
 - vi. Dois minutos a 68 °C
 - vii. Cinco minutos a 68 °C
 - viii. Preservar a quatro graus

Cinco vezes

40 vezes

O amplicon foi purificado e clonado por recombinação no vetor usando o sistema In-Fusion HD EcoDry Cloning Plus (TaKaRa Clontech) de acordo com recomendações do fabricante. O sistema foi transformado e o plasmídeo recombinante foi purificado para transformação por biobalística na cepa *mlc1*.

Para observação da quimera, células da cepa *mlc1::MLC1-GFP* foram tratadas com o corante nuclear Hoechst 33342 (NucBlue[®] Live Reagent, Thermo Fisher Scientific) antes da microscopia, que foi feita no instrumento citado anteriormente. Para documentação da fluorescência, foram usados os filtros 38 HE para a GFP e 49 DAPI para o Hoechst.

Soluções complexas

Meio mínimo

- 29.4 mM KH_2PO_4
- 10 mM MgSO_4
- 13 mM glicina
- 3 μM tiamina
- 15 mM dextrose

Ágar SLAD

- 0.17% base nitrogenada de levedura sem aminoácidos (YNB)
- 50 μM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 20 g/L dextrose
- 20 g/L agar

Ágar DMEM-MOPS

- 13,5 g/L DMEM
- 44 mM NaHCO_3
- 50 mM MOPS
- 18 g/L ágar
- pH 7

Sabouraud/MOPS

- 4 g/L dextrose
- 1 g/L peptona
- 50 mM MOPS
- pH 5,6

YPD

- 20 g/L peptona
- 10 g/L extrato de levedura
- 20 g/L dextrose
- pH 5,6
- Para meio sólido, 20 g/L ágar

Ágar L-DOPA

- 29.4 mM KH_2PO_4
- 10 mM MgSO_4
- 13 mM glicina
- 15 mM dextrose
- 3 μM tiamina
- 2 mM L-DOPA
- 15 g/L ágar

Ágar de uréia de Cristensen

- 0.2% peptona
- 86 mM NaCl
- 14.7 mM KH_2PO_4
- 333 mM uréia
- 45 μM vermelho de fenol
- pH 6.9

Ágar de gema de ovo

- 8% (v/v) de gema de ovo
- 0.8% peptona
- 1.6% dextrose
- 0.84 M NaCl
- 42 mM CaCl_2
- 16 g/L ágar

Tampão TENTS

- 10 mM Tris-HCl
- 1 mM EDTA
- 100 mM NaCl
- 2% (v/v) Triton X-100

- 10 g/L SDS
- pH 7,5

Tampão CTAB

- 100 mM Tris-Cl (pH 8.0)
- 20 mM EDTA (pH 8.0)
- 1.4 M NaCl
- 2% (p/v) CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)
- 1% PVP 40,000 (polyvinyl pyrrolidone)

Resultados

Estrutura do gene *MLC1*

Para identificar homólogos de FTs da família Gti1/Pac2 em *C. neoformans* além de Liv3³⁸, usou-se a seqüência do membro do clado de Gti1 em *H. capsulatum*, Ryp1, como termo de busca numa varredura do banco de dados do genoma da cepa H99 no Instituto Broad pelo algoritmo BlastP. Os dois únicos retornos foram uma ORF não-anotada, CNAG_01983 (valor de E , $5,6 \times 10^{-45}$, identidade de 42%, similaridade de 57% na região de alinhamento de 247 resíduos) e Liv3 (valor de E , $1,9 \times 10^{-11}$, identidade de 34%, similaridade de 53% na região de alinhamento de 114 resíduos). O melhor retorno da CNAG_01983 no teste de reciprocidade contra o banco de dados de *H. capsulatum* foi Ryp1. Em *S. pombe*, a CNAG_01983 e Liv3 são os melhores alinhamentos, respectivamente, de Gti1 e Pac2, conforme descrito no trabalho de *F. oxysporum*⁴⁹.

A CNAG_01983, que posteriormente foi nomeada de *MLC1*, foi inicialmente submetida a uma busca pelas regiões WOPRa e WOPRb usando a ferramenta de análise de seqüência protéica ELM⁷², que fora usada com sucesso para a definição dessas regiões no FT Wor1 em *C. albicans*⁵¹. Assim como em Wor1, dois domínios

globulares foram identificados na porção N-terminal, e o primeiro deles (WOPRa; resíduos de 17 a 95) contém a treonina conservada (Thr⁷¹) dos membros da família Gti1/Pac2 que é sabidamente fosforilada em *F. oxysporum*⁴⁹. A proteína Mlc1 possui 626 resíduos de aminoácidos e a porção C-terminal, ao contrário da N-terminal, não é conservada, o que também está de acordo com o observado na literatura⁵¹. A região N-terminal permite a classificação da proteína como pertencente à família Gti1/Pac2 pela ferramenta de análise de domínios conservados InterproScan (<http://ebi.ac.uk>). Tentou-se realizar um alinhamento múltiplo de sequências com outras proteínas da família, mas o grau de conservação fora da região N-terminal é muito baixo e alguns membros da família não acusam regiões WOPR à varredura pelo servidor ELM. No entanto, mesmo que se use apenas a região mais conservada (WOPRa) de uma proteína de outro fungo (como por exemplo, Wor1 de *C. albicans*) como termo de busca, o BlastP retorna apenas Mlc1 e Liv3 em *C. neoformans*, indicando fortemente que, como em outros fungos, apenas duas proteínas desta família existem neste basidiomiceto.

A estrutura da proteína Mlc1 se encontra à figura 8.

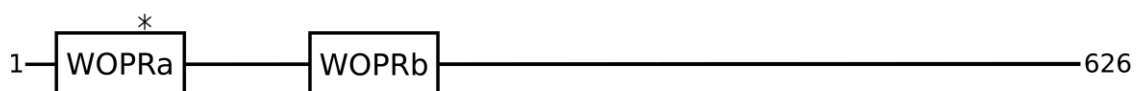


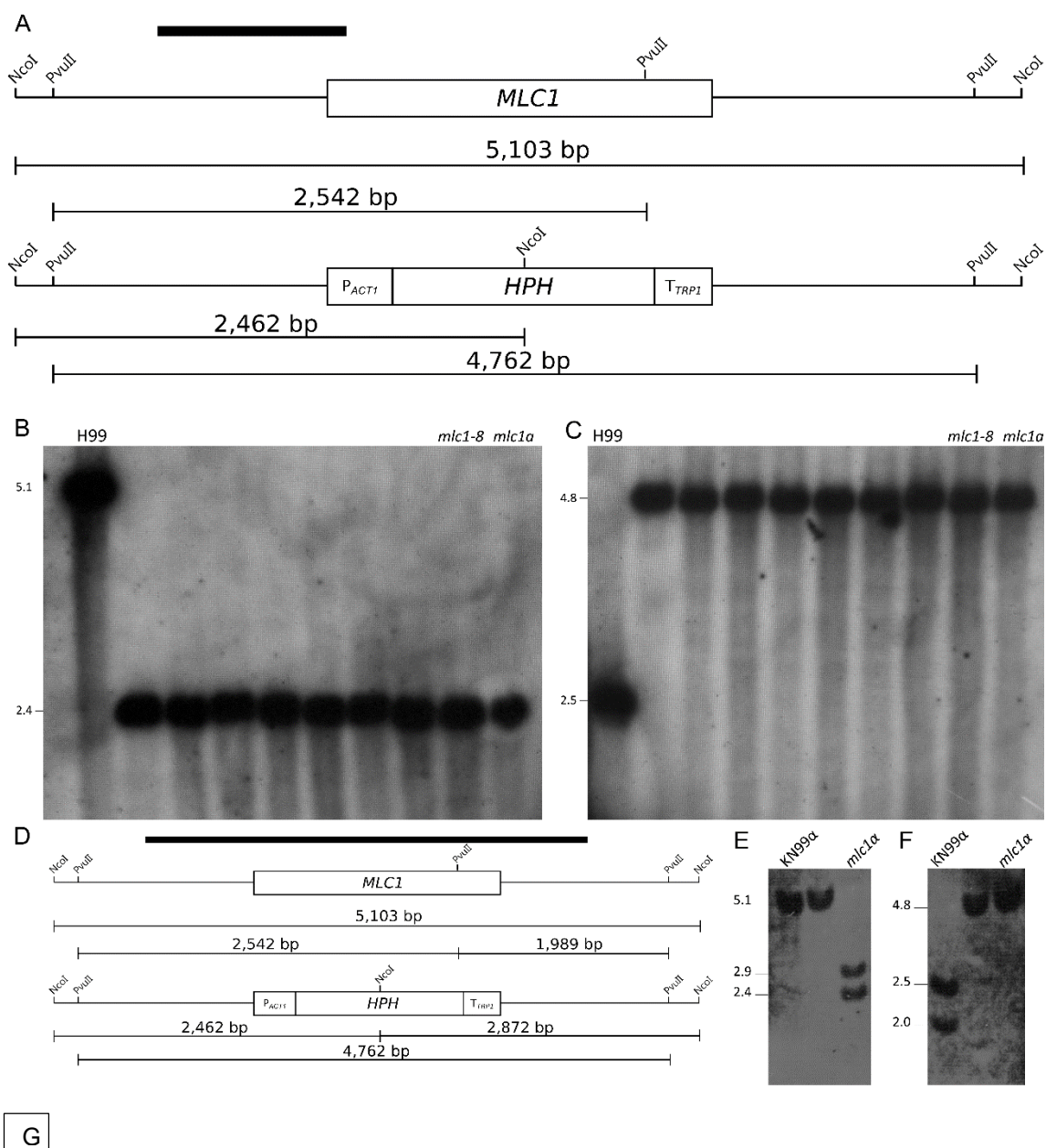
Figura 8. Esquema, em escala, da proteína Mlc1 de *C. neoformans*. O asterisco indica a treonina-71. WOPRa, resíduos 17-95; WOPRb, 168-248

Deleção e reconstituição do gene *MLC1*

O gene *MLC1* foi deletado em três cepas, todas com a marca de resistência à higromicina: H99, KN99a e KN99 α , estas últimas sendo tradicionalmente usadas para estudos de acasalamento. Em todos os casos a deleção foi bem-sucedida conforme constante à figura 9. A cepa derivada de H99, a partir daqui, é chamada *mlc1*, enquanto que os mutantes baseados nas cepas férteis de referência foram chamados *mlc1a* e *mlc1 α* . A cepa *mlc1::MLC1* foi gerada a partir de *mlc1*, e a eficácia da reconstituição foi igualmente confirmada à mesma figura.

Fenótipos negativos do mutante *mlc1*

A cepa mutante, em meio YPD sólido, não apresentou diferenças morfológicas em relação à cepa parental H99, seja a 30 °C ou a 37 °C. Tampouco apresentou diferenças de melanização, secreção de urease ou fosfolipase, déficit de crescimento na presença de estressores osmóticos, oxidantes ou de parede, conforme constante à figura 10.



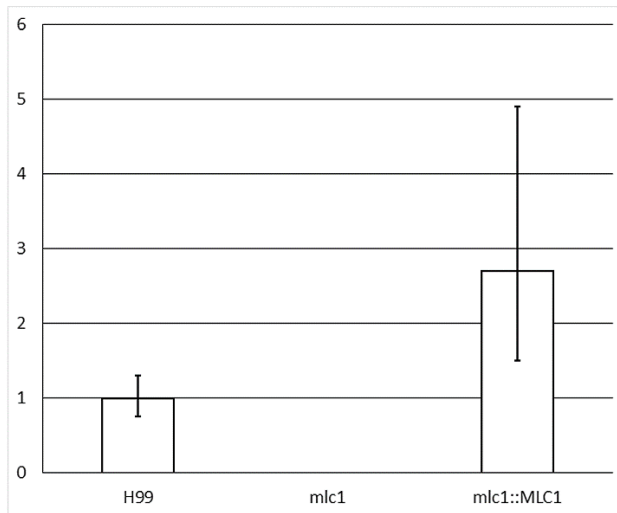


Figura 9. (página anterior) (A) Mapa do *locus MLC1* de *C. neoformans* (não está em escala), indicados os sítios de restrição de *NcoI* e *PvuII*, e do cassete de deleção contendo a marca de resistência à higromicina (*HPH*). Estão indicados os tamanhos esperados das bandas hibridadas à sonda (barra negra) nas cepas parental e mutante. (B) Hibridação da sonda em membrana de candidatos a mutante *mlc1* (parental, H99; oito candidatos) e *mlc1a* (parental, KN99a; um candidato), cujo DNA foi digerido com *NcoI*. (C) Mesmas amostras de B, porém digeridas com *PvuII*. B e C, sistema DIG. (D) Esquema do *locus* como em A, porém para a sonda AlkPhos[®], e os tamanhos de banda correspondentes, usados para o mutante *mlc1a*. (E e F) Hibridação em membrana do DNA genômico de dois candidatos a mutante *mlc1a* (parental, KN99a) digerido com *NcoI* (E) e *PvuII* (F) à sonda AlkPhos[®]. Apenas as cepas controle e os candidatos escolhidos para estudo estão nomeados no mapa. (G) Confirmação da reconstituição do gene *MLC1* por restauração da presença do transcrito correspondente à PCR em tempo real.

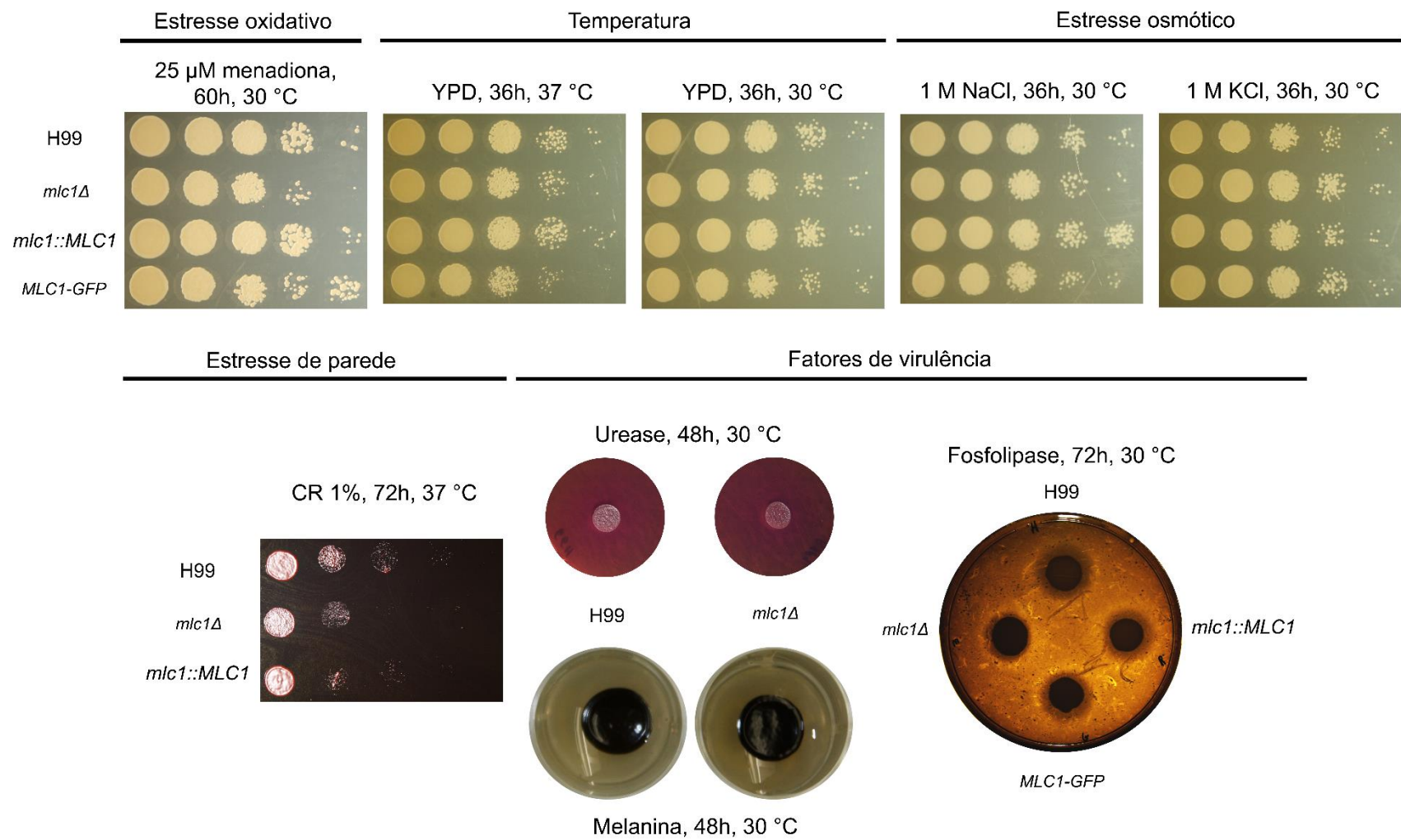


Figura 10: Fenótipos negativos do mutante *mlc1*. CR, Vermelho Congo.

Produção de cápsula e secreção de GXM no mutante *mlc1*

A primeira observação de um defeito na produção de cápsula foi em mutantes *mlc1a* e *mlc1 α* , derivados das cepas férteis (KN99a e KN99 α), que foram os primeiros a serem feitos, incubados em meio Sab/MOPS (figura 11).

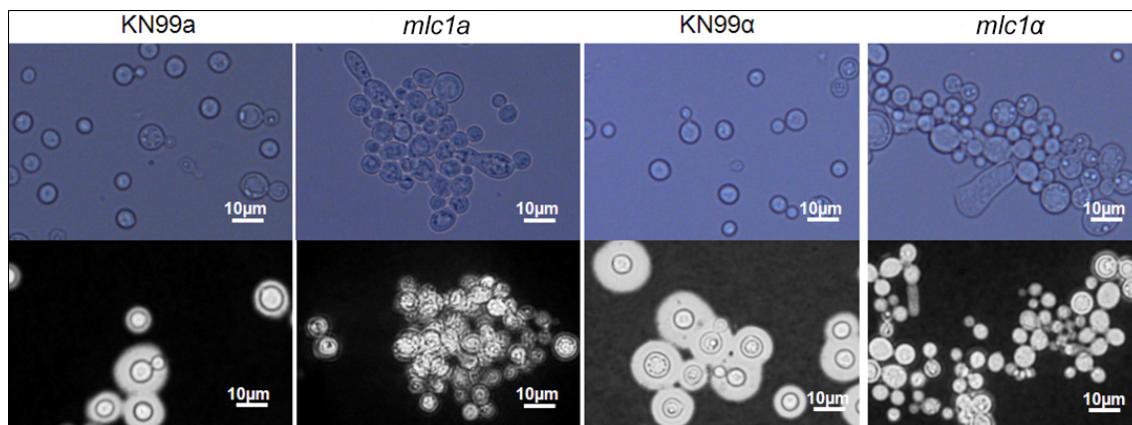


Figura 10. Ausência de cápsula em mutantes *mlc1*. Sete dias de incubação em Sab/MOPS a 37 °C. Observam-se nestas micrografias os grumos, que foram investigados em outros experimentos. A cápsula aparece, nas cepas parentais KN99a e KN99 α , como halos ao redor dos corpos celulares. Fileira superior, células em meio de cultura; fileira inferior, contraste com tinta nanquim.

No caso do mutante derivado de H99, em meio sólido indutor de cápsula (DMEM/MOPS), notou-se que a cepa *mlc1* falhava em gerar uma colônia mucóide, que é indicativa de alto conteúdo de GXM, e indicativa da presença de uma cápsula espessa. Para investigar a observação qualitativa e quantitativa, mediu-se a cápsula de leveduras das cepas mutante, selvagem e reconstituída, além de detectar a GXM de superfície e quantificar a secretada. Os resultados, à figura 12, indicam que a cepa *mlc1* mantém apenas uma cápsula basal, que falha em se tornar mais espessa mediante indução; e o mutante também apresenta defeito na secreção de GXM, conforme constante à mesma figura. A perda de espessamento de cápsula, medida pela razão entre o volume capsular e o da célula, foi de aproximadamente 75% para a cepa mutante. No caso da GXM secretada, notou-se que após uma etapa de indução inicial (primeiras 48 horas) em que o mutante foi

indistinguível das cepas selvagem e reconstituída, a segunda fase da secreção, responsável pela maior parte do acúmulo de GXM no meio de cultura, foi abolida na cepa *mlc1*.

Defeito de crescimento no mutante *mlc1*

Durante os experimentos anteriores, notou-se que a densidade celular das culturas de *mlc1* a 37 °C sempre parecia menor do que a das cepas controles. Por isso, geraram-se curvas de crescimento em CIM e YPD, a 30 °C e a 37 °C.

Conforme mostrado à figura 13, *mlc1* apresenta crescimento retardado, atingindo fase estacionária em densidades menores do que as cepas selvagem e reconstituída.

Defeito de citocinese no mutante *mlc1*

Já se observara que o mutante gerava grumos em meio Sabouraud/MOPS. O mesmo fenômeno ocorreu nas curvas de sobrevivência, especialmente na condição CIM 37° C, que apresentou grandes barras de dispersão nos pontos mais tardios para a cepa *mlc1* (figura 13). Esses grumos são consequência da formação de aglomerados celulares que tornam a suspensão de leveduras opticamente heterogênea. À microscopia de luz, a figura 14 mostra que esses aglomerados podem conter centenas de células e incluem leveduras com morfologia anômala, algumas com aparência de pseudo-hifa ou crescimento polar e largos vacúolos. Essa morfologia foi documentada à vídeo-microscopia (dados não mostrados), que indica tratar-se de um defeito de citocinese, visto que as células de um aglomerado são todas descendentes de uma mesma célula-mãe. Isso é confirmado à sonicação: os grumos não se desfazem, mesmo a exposições de intensidade suficiente para destruir as células (figura 14C).

Déficit de virulência do mutante *mlc1*

Em vista da frequência com que proteínas da família Gti1/Pac2, especialmente aquelas filogeneticamente alinhados com Gti1, estão implicadas na virulência das espécies correspondentes, foi analisado o papel de Mlc1 na virulência de *C. neoformans in vitro* e *in vivo*.

Em macrófagos da linhagem J774A.1 (figura 15), a cepa *mlc1* apresentou significativa queda de viabilidade em comparação com as cepas H99 e *mlc1::MLC1*. Essa diferença não foi devida a déficit na fagocitose do mutante, uma vez que em todos os experimentos o índice fagocítico, aqui definido como a percentagem de macrófagos contendo criptococo em relação ao número total de células, foi de 50% em todas as condições.

Em modelo murino, a cepa mutante foi avirulenta, e no modelo de infecção em invertebrado (*G. mellonella*), *mlc1* foi avirulenta a 37 °C e hipovirulenta a 30 °C (figura 16). As medianas de mortalidade para as cepas selvagem e reconstituída foram de seis dias para *Galleria* a 30 °C, sete dias para *Galleria* a 37 °C e 21-22 dias em camundongo.

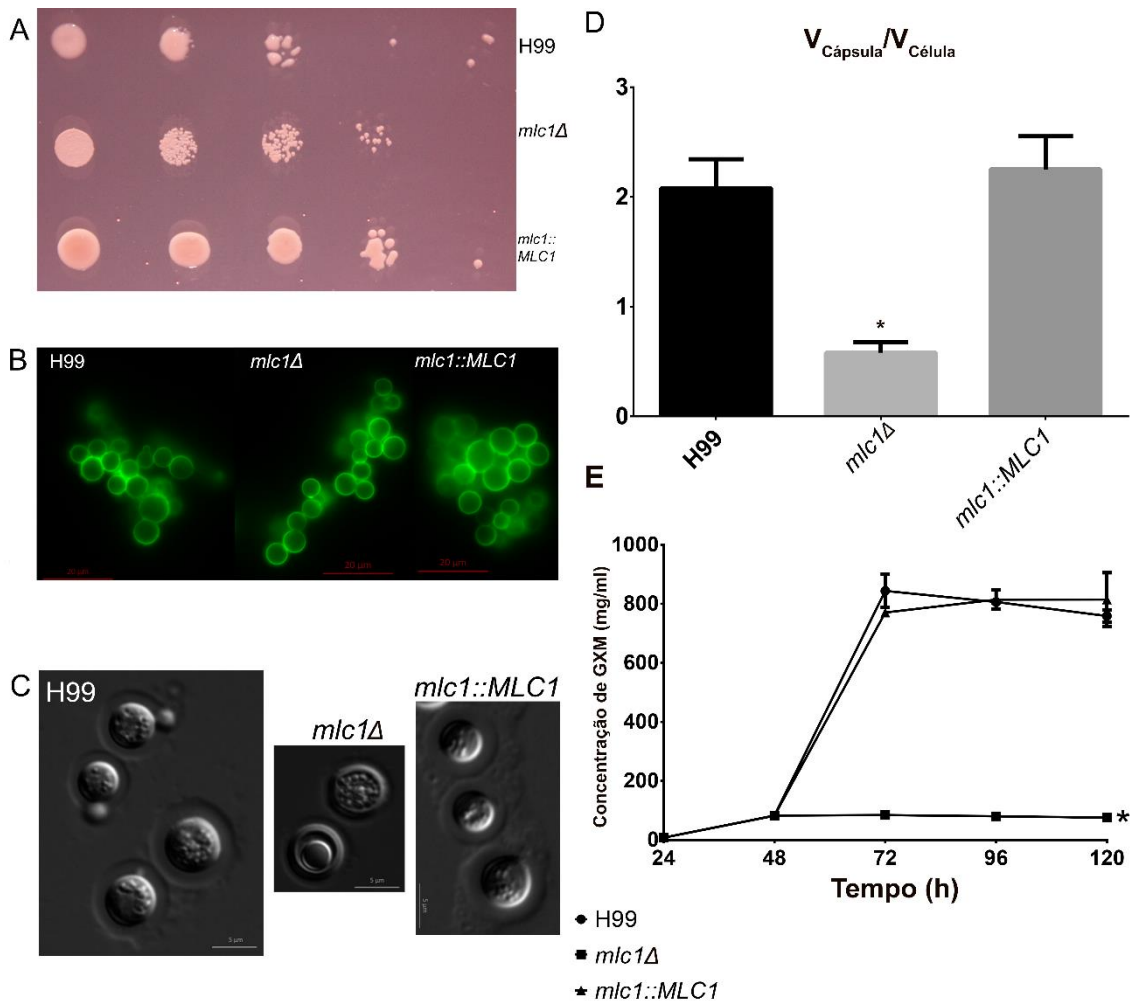


Figura 12. (A) Em meio DMEM-MOPS de indução de cápsula, a cepa *mlc1* apresenta-se ressecada em comparação ao aspecto mucóide de H99 e *mlc1::MLC1*. (B) Detecção de GXM na superfície de células de *C. neoformans* por imunofluorescência. Os grumos são um artefato do anticorpo 2D10, uma IgM. (C) À microscopia de contraste de interferência diferencial na presença de Percoll®, a cápsula do mutante, observável como um halo de relevo ao redor das células, é nitidamente reduzida com relação às cepas parental e reconstituída. (D) A redução da cápsula, conforme indicada pela comparação das razões de volume de cápsula por volume do corpo celular. O asterisco indica diferença significativa ao teste de Tukey ($p < 0,0001$). Os valores são medianas e as barras são IC95%. (E) Curva temporal da dosagem por ELISA da GXM secretada por células das três cepas em meio mínimo ao longo de 120 horas. O asterisco indica que a diferença foi estatisticamente significativa ao teste de comparações múltiplas de Dunnett ($p < 0,05$). Os pontos são médias e as barras são desvios padrões.

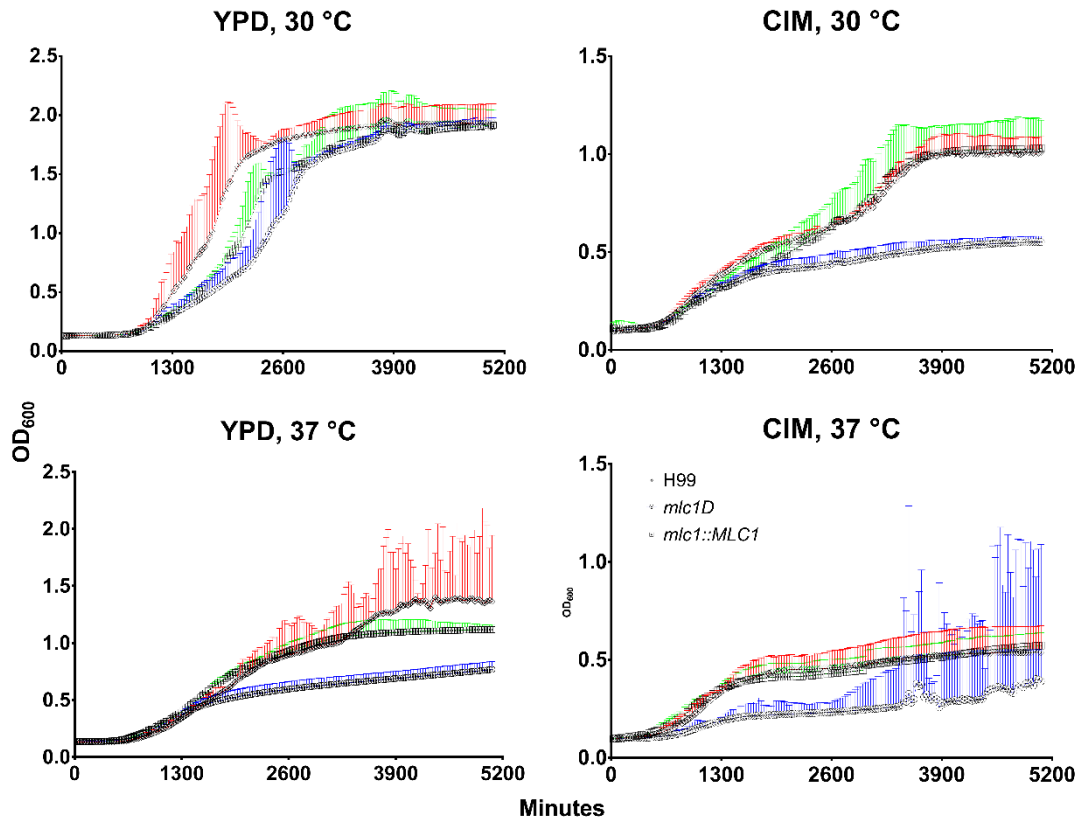


Figura 13. Curvas de crescimento, medido em termos de densidade óptica a 600 nm, das cepas H99, *mlc1* e *mlc1::MLC1* em CIM e YPD, a 30 °C e 37 °C, ao longo de 84 horas. Os pontos são médias de três replicatas experimentais e as barras são IC95%. Vermelho, H99; azul, *mlc1*; verde, *mlc1::MLC1*.

Em modelo murino, avaliou-se a carga fúngica no cérebro e no pulmão dos animais infectados, e o mutante foi completamente eliminado dos pulmões de camundongos infectados. Porém, notou-se que ele persistia, assintomaticamente, no cérebro dos animais infectados por mais tempo, conforme mostra a figura 17: nos pulmões, a carga fúngica das cepas selvagem e reconstituída apresentou mediana na faixa de $3-5 \times 10^6$ células por grama de tecido; no cérebro, a carga mediana foi da ordem de 2×10^4 células para ambas as cepas, e de 7×10^3 para a cepa *mlc1* (essa diferença não atingiu significância estatística em vista da grande dispersão dos valores entre os animais). Além disto, observou-se que os animais infectados com o mutante retinham fungo no cérebro 100 dias após a infecção ($3,5 \times 10^5$ UFC/g), sem demonstrar sintomas. Isso indica que o fungo chega a aumentar

sua densidade no cérebro com relação ao período inicial de infecção, mas após seis meses, constatou-se eliminação também do cérebro.

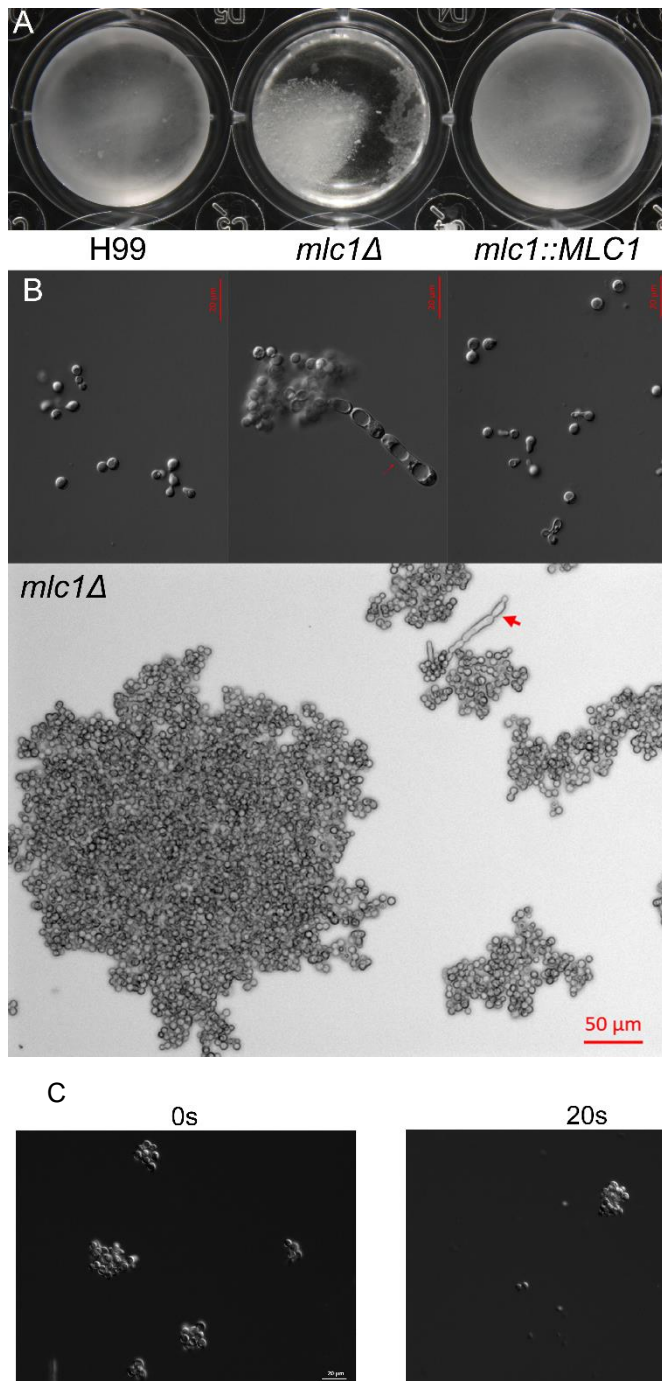


Figura 14. (A) Aparência a olho nu de culturas de células das cepas selvagem, mutante *mlc1* e reconstituída em meio Sabouraud-MOPS por cinco dias. (B) Aparência microscópica das células de (A). No painel inferior, o mutante *mlc1* aparece em menor magnificação para ilustrar o tamanho dos aglomerados celulares. As setas vermelhas são as estruturas de crescimento polar/pseudo-hifa. Os painéis superiores são em DIC e o inferior é em campo claro. (C) DIC de vários tempos de sonicação de células *mlc1* crescidas em Sabouraud-MOPS por cinco dias. Em nenhum momento os grumos se desfazem.

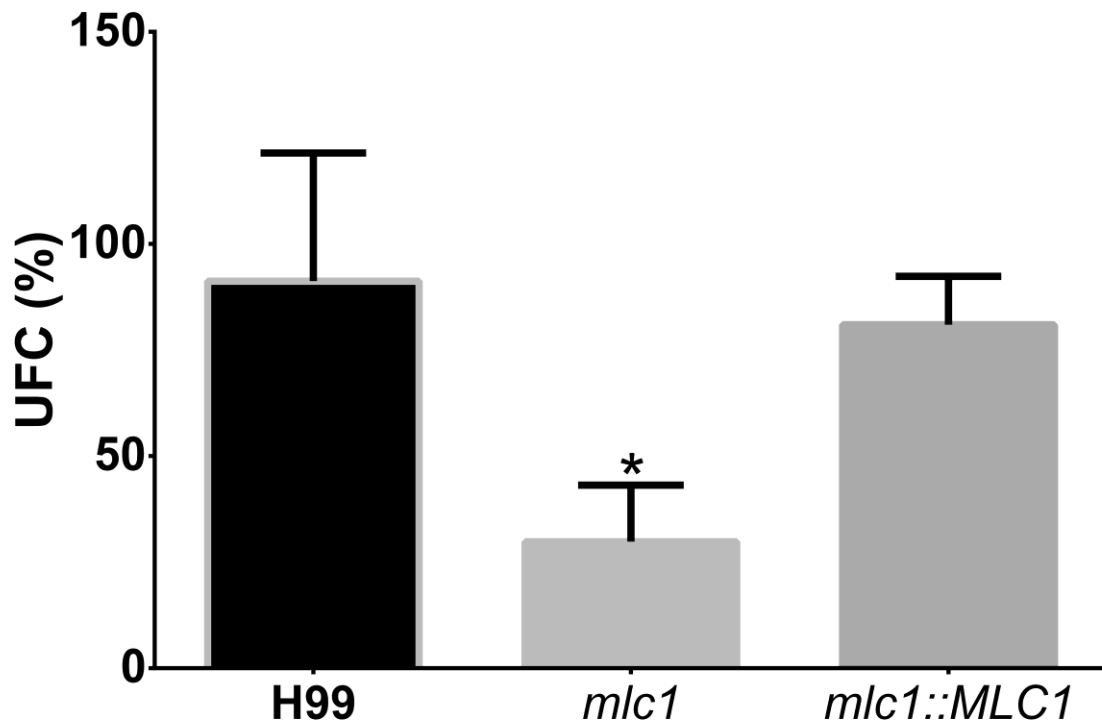


Figura 15. Ensaio de sobrevivência no interior de macrófagos J774A.1 (experimento representativo de três). O eixo Y indica o número de UFC como porcentagem da replicata com maior valor para a cepa H99 (100%). O asterisco indica significância estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,0001$).

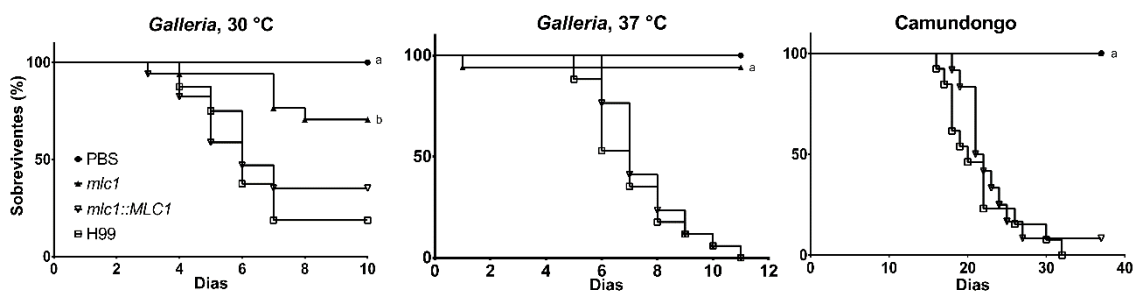


Figura 16. Curvas de sobrevivência em *G. mellonella* e camundongo. A letra (a) indica avirulência (grupo estatisticamente indistinguível do grupo de PBS) e (b) indica hipovirulência (estatisticamente distinto tanto do grupo de PBS como do grupo de H99 e *mlc1::MLC1*) pelo teste de ranqueamento logarítmico.

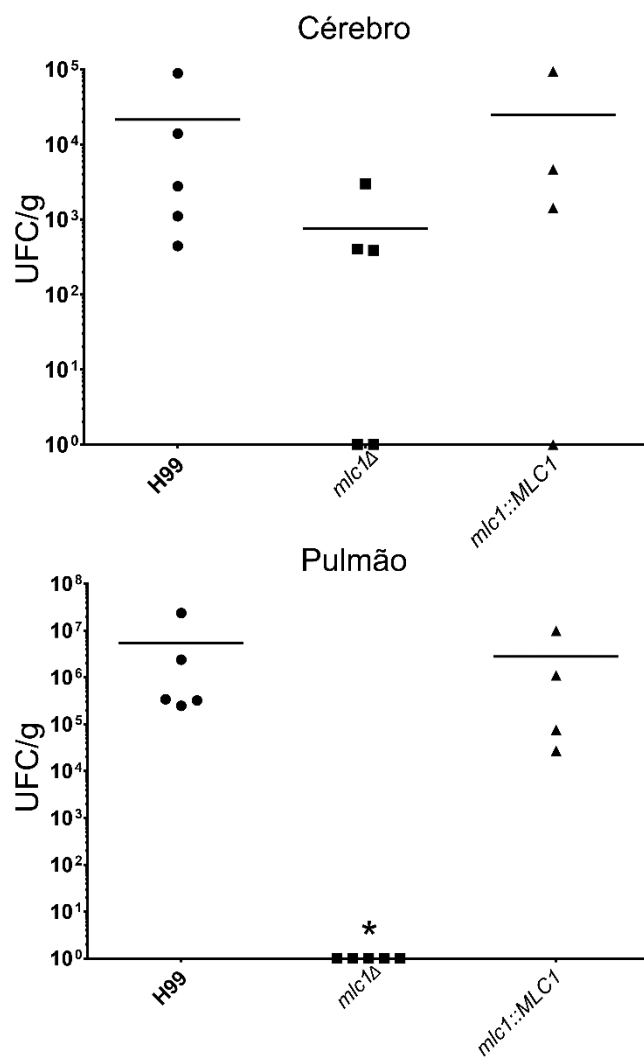


Figura 17. Dosagem de carga fúngica em animais infectados com *C. neoformans* das linhagens H99, *mlc1* e *mlc1::MLC1*. Cada ponto representa um animal e a barra indica a média da carga fúngica para aquele grupo. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Citocalização da proteína Mlc1

Construiu-se uma quimera Mlc1-GFP para confirmar se a proteína teria, como se espera de um fator de transcrição, topologia nuclear. Esta foi confirmada por microscopia de fluorescência conforme mostra a figura 18, em que o corante Hoechst 33342 foi usado como marcador nuclear, e em que se viu que os sinais de GFP e Hoechst se encontram sobrepostos. Também foi possível constatar que a topologia nuclear da quimera Mlc1-GFP ocorre na maioria das células.

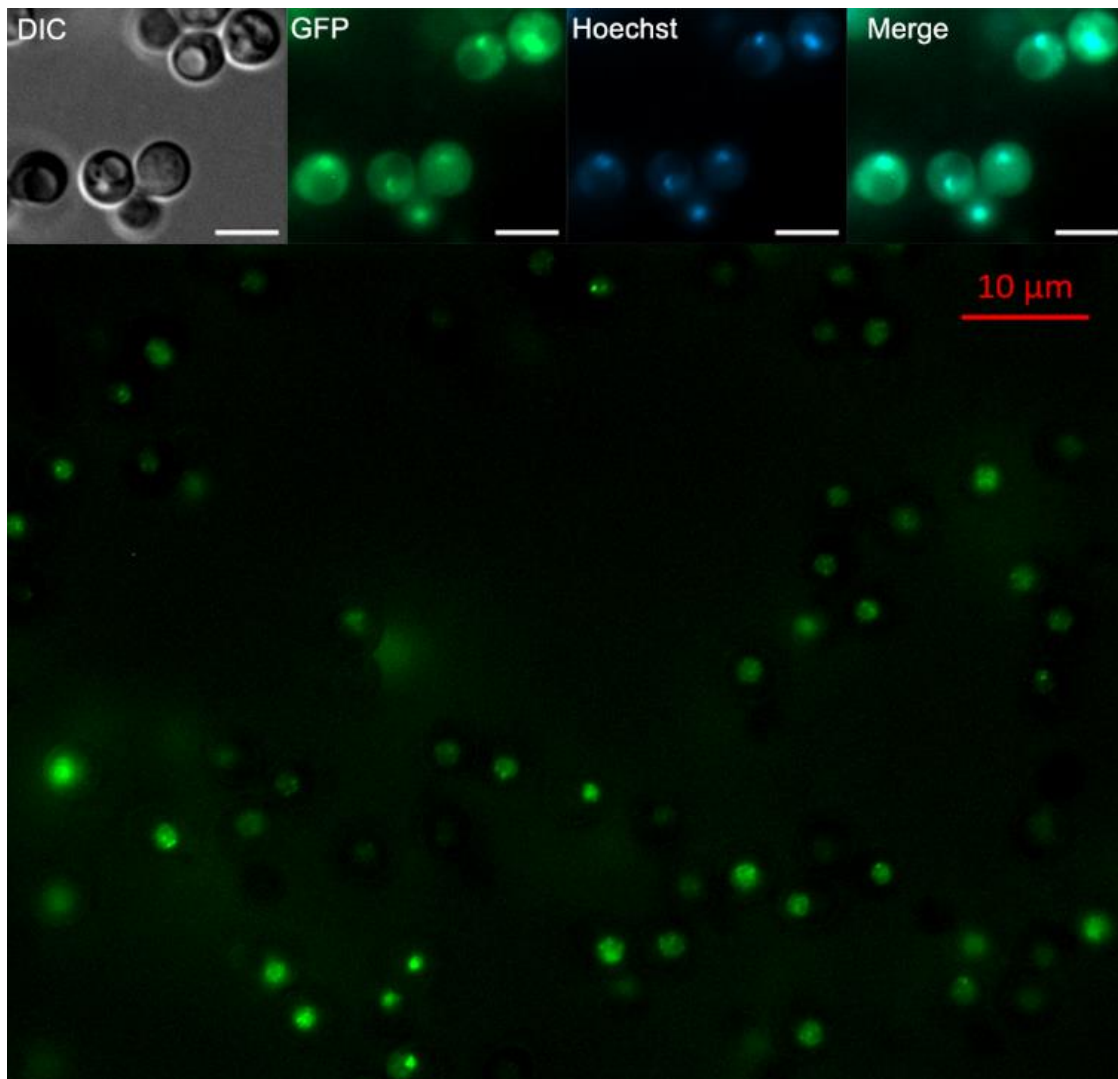


Figura 18. Microscopia de fluorescência mostrando a colocalização do sinal de fluorescência da quimera Mlc1-GFP e o fluoróforo Hoechst 33342, que emite sinal mediante ligação ao DNA. Nos painéis superiores, a barra branca corresponde a cinco micrômetros. No painel inferior, observa-se que a maioria das células da cepa *mlc1::MLC1-GFP* apresenta o sinal de fluorescência com topologia nuclear. As células foram obtidas de cultura vegetativa em YPD a 30 °C por uma noite.

Análise do transcriptoma do mutante *mlc1*

Como Mlc1 pertence a uma família de fatores de transcrição, avaliaram-se mudanças na expressão gênica da cepa mutante numa condição em que os fenótipos verificados *in vitro* se manifestam, CIM, 37 °C por quatro horas, que foi usada para obtenção do RNA para seqüenciamento.

Um total de 350 ORFs, segundo a anotação do genoma da cepa parental H99 no Instituto Broad, foi diferencial entre ela e a cepa *mlc1* na condição escolhida.

Delas, 195 foram induzidas e 155, reprimidas, listadas à tabela II do apêndice. Pela classificação de ontologia gênica, algumas categorias foram enriquecidas, conforme visível à figura 20. As ORFs pertencentes a categorias para as quais houve enriquecimento de transcritos diferenciais – indicando significância fisiológica do achado – estão listadas na tabela 2.

Tabela 2. Categorias de GO para as quais houve enriquecimento. Elas correspondem aos ramos terminais dos grafos da figura 20, e foram obtidas pelo programa Blast2GO. Há redundância entre elas porque alguns transcritos pertencem a mais de uma categoria.

Categoria de GO	ID	Nome	Regulação
	CNAG_07463	separase	reprimido
	CNAG_06814	proteína hipotética	reprimido
	CNAG_07408	STE/STE20/PAKA proteína cinase	reprimido
	CNAG_07411	Histona demetilase JARID1	reprimido
	CNAG_01454	fator de transcrição STE12	reprimido
	CNAG_01333	Haspin proteína cinase	reprimido
	CNAG_02345	polycomb proteína EED	reprimido
	CNAG_02337	uracil fosforibosyltransferase	reprimido
	CNAG_02095	ciclina	reprimido
	CNAG_02051	membro da família de cinesinas 20/23	reprimido
Núcleo (GO 0005634)	CNAG_03453	membro da família de cinesinas 11	reprimido
	CNAG_03539	proteína hipotética	reprimido
	CNAG_07756	Cdc	reprimido
	CNAG_04148	NEK proteína cinase	reprimido
	CNAG_04836	Proteína nuclear	reprimido
	CNAG_01572	tirosina fosfatase	reprimido
	CNAG_06188	proteína hipotética	reprimido
	CNAG_00505	proteína hipotética	induzido
	CNAG_02986	ADP-ribose pyrofosfatase	induzido
	CNAG_02877	proteína hipotética	induzido
	CNAG_00883	Fator de transcrição Zn2Cys6	induzido
	CNAG_04312	manose-6-fosfato isomerase	induzido

	CNAG_04879	Enzima desramificadora do glicogênio	induzido
	CNAG_06098	glucosamina-6-fosfato deaminase	induzido
	CNAG_00681	subunidade 3 do complexo da condensina	reprimido
	CNAG_03993	Proteína associada a microtúbulos da família RP/EB	reprimido
	CNAG_01333	Haspin proteína cinase	reprimido
	CNAG_02051	membro da família de cinesinas 20/23	reprimido
	CNAG_05752	membro da família de cinesinas C1	reprimido
Divisão nuclear mitótica (GO 0007067)	CNAG_05853	proteína hipotética	reprimido
	CNAG_03184	BUB proteína cinase	reprimido
	CNAG_03453	membro da família de cinesinas 11	reprimido
	CNAG_07756	Cdc	reprimido
	CNAG_04148	NEK proteína cinase	reprimido
	CNAG_01907	PLK/PLK1 proteína cinase	reprimido
	CNAG_06335	Proteína centromérica E	reprimido
	CNAG_07463	separase	reprimido
	CNAG_03993	Proteína associada a microtúbulos da família RP/EB	reprimido
	CNAG_06971	proteína hipotética	reprimido
	CNAG_07408	STE/STE20/PAKA proteína cinase	reprimido
	CNAG_01389	proteína hipotética	reprimido
	CNAG_01333	Haspin proteína cinase	reprimido
Citoesqueleto (GO 0005856)	CNAG_02194	AGC/NDR proteína cinase	reprimido
	CNAG_02095	Ciclina	reprimido
	CNAG_02051	membro da família de cinesinas 20/23	reprimido
	CNAG_05752	membro da família de cinesinas C1	reprimido
	CNAG_03539	proteína hipotética	reprimido
	CNAG_06335	Proteína centromérica E	reprimido
	CNAG_00682	cinesina	induzido
Organização do citoesqueleto (GO 0007010)	CNAG_00110	proteína hipotética	reprimido
	CNAG_07463	separase	reprimido

CNAG_03993	Proteína associada a microtúbulos da família RP/EB	reprimido
CNAG_07408	STE/STE20/PAKA proteína cinase	reprimido
CNAG_06980	STE/STE11 proteína cinase	reprimido
CNAG_02194	AGC/NDR proteína cinase	reprimido
CNAG_05752	membro da família de cinesinas C1	reprimido
CNAG_03453	membro da família de cinesinas 11	reprimido
CNAG_04148	NEK proteína cinase	reprimido
CNAG_01907	PLK/PLK1 proteína cinase	reprimido
CNAG_06335	Proteína centromérica E	reprimido

As mudanças mais drásticas no padrão de expressão se deram em genes do *locus MAT α* . Dentre as 26 ORFs anotadas automaticamente, 16 foram reprimidas quase que completamente na cepa *mlc1* ao RNA-Seq. Quinze delas correspondiam a ORFs que um estudo anterior descobriu serem induzidas em criptococos fagocitados por macrófagos em cultura⁷³. Das onze ORFs não diferenciais, quatro (CNAGs 01456, 06805, 06807 e 06810) não possuem correspondente em quaisquer outras cepas seqüenciadas de *C. neoformans* e parecem ser artefatos de anotação automatizada ou sequências parciais geradas por eventos de transposição gênica. Isso indica que 16 de 22, ou 72% das ORFs sabidamente codificadoras de proteínas do *locus MAT α* são reguladas por *Mlc1*, a maioria (15/16=94%) também induzidas no interior de macrófagos. A figura 19 ilustra o resultado.

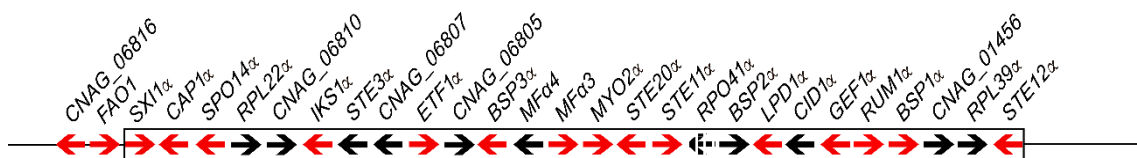


Figura 19. Estrutura do *locus MAT α* de *C. neoformans* (retângulo). As ORFs em vermelho tiveram seus transcritos reprimidos no mutante *mlc1*. As duas ORFs imediatamente a montante do *locus* também foram reprimidas. Dentro do *locus*, as ORFs em vermelho também foram induzidas em H99 fagocitado por macrófagos em cultura (referência 63). A ORF *RPO41 α* (listrada) foi induzida no macrófago, mas não reprimida no mutante *mlc1*. Não está em escala.

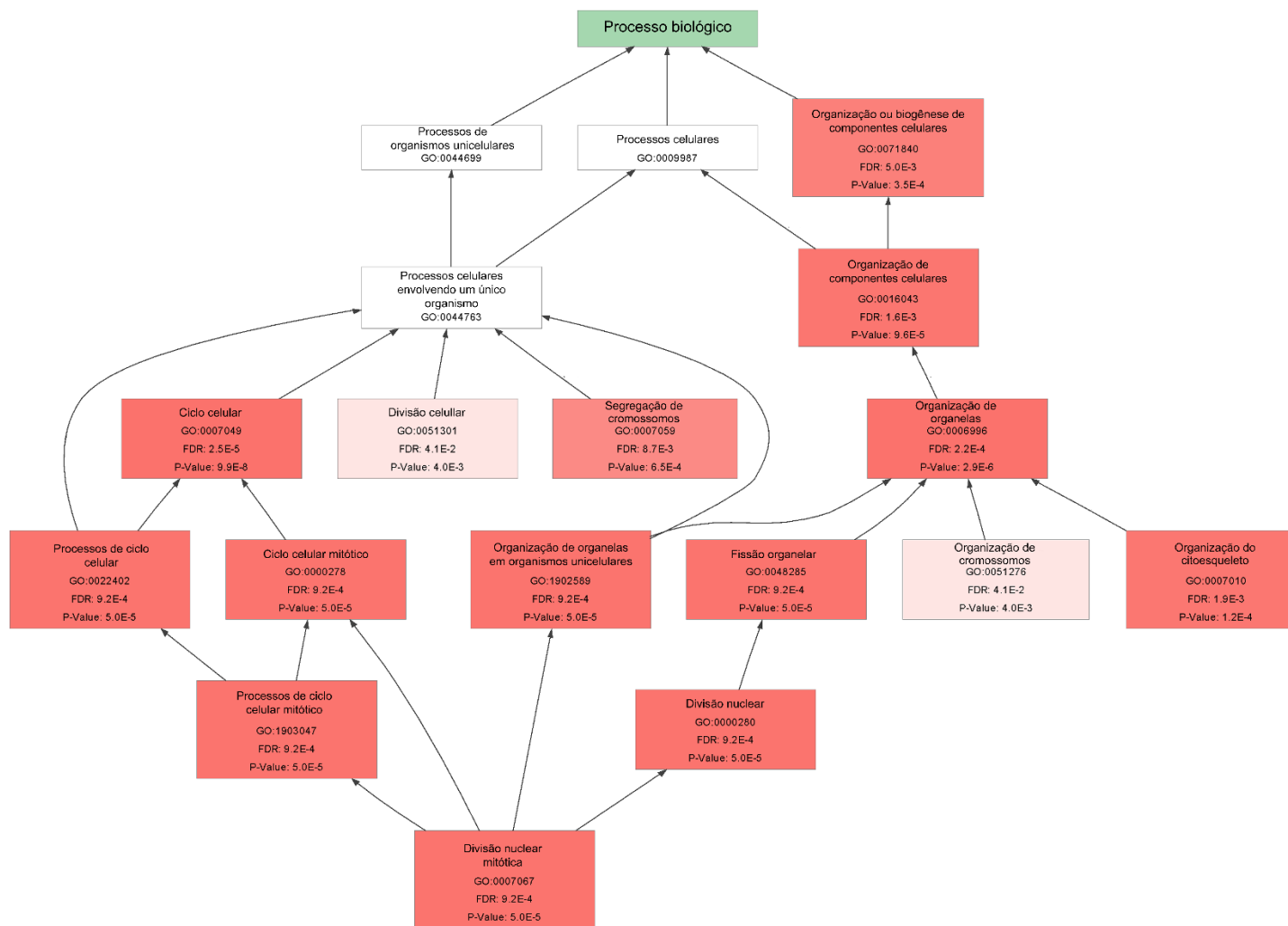


Figura 20 (continua)

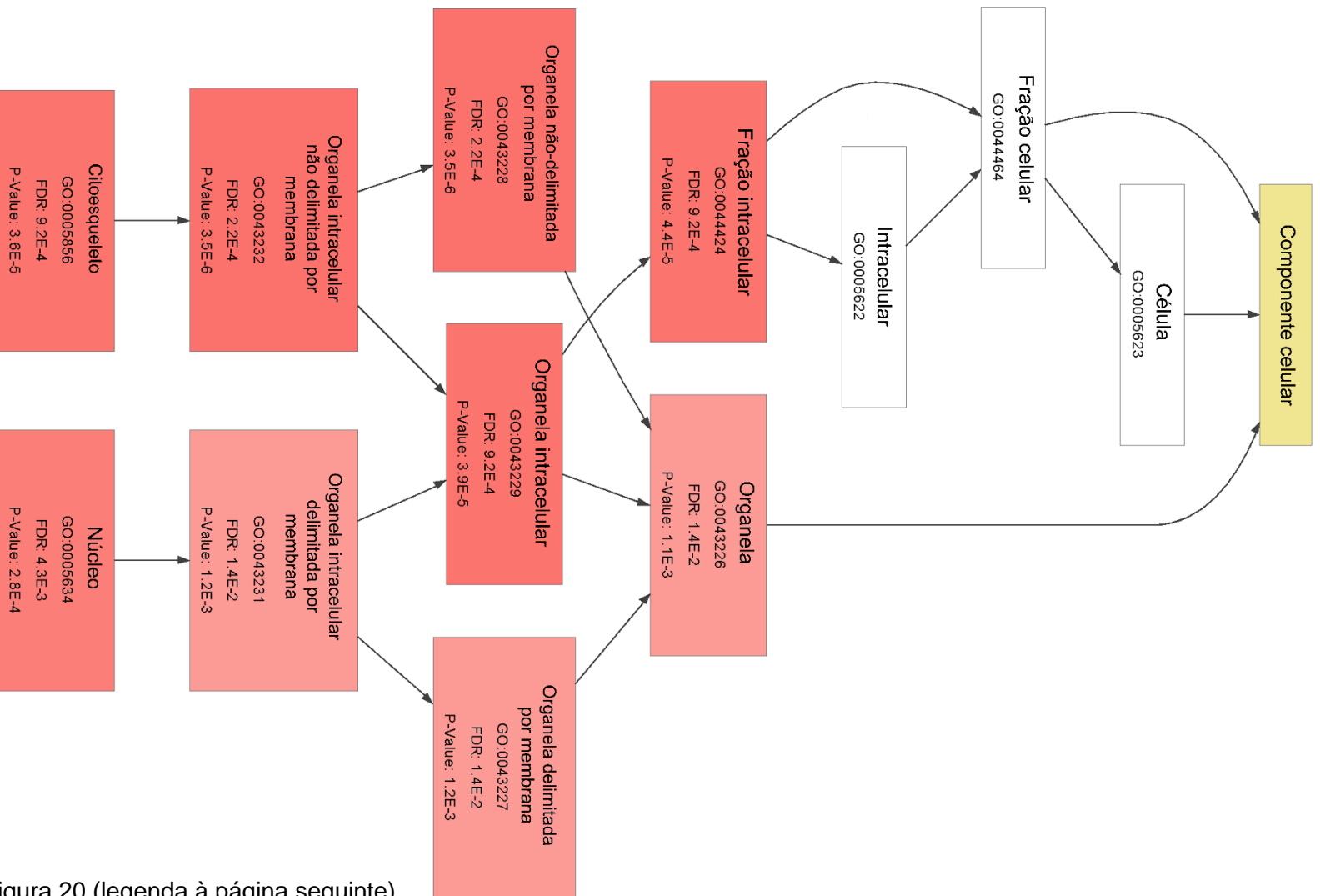


Figura 20 (legenda à página seguinte)

Figura 20. (duas páginas anteriores) Grafos de ontologia gênica, gerados pelo programa Blast2GO, contendo as categorias para as quais houve enriquecimento de transcritos diferenciais no mutante *mlc1* em CIM a 37 °C por quatro horas. Branco indica ausência de enriquecimento e, quanto mais baixo o valor de P do cálculo de enriquecimento, mais intensa a coloração magenta da categoria. As categorias mais terminais estão contidas nas mais proximais. Usou-se uma taxa de descoberta falsa (FDR) de 5% como limiar. As ORFs das categorias terminais estão listadas no apêndice.

A figura 21 ilustra a validação, por PCR em tempo real, dos dados de RNA-Seq, pela confirmação de que 14 transcritos (de um total de 18 selecionados arbitrariamente), incluindo dez do *locus MAT α* , duas reprimidas e duas induzidas, mostraram padrões de regulação semelhantes àqueles observados na análise de transcriptoma por RNA-Seq.

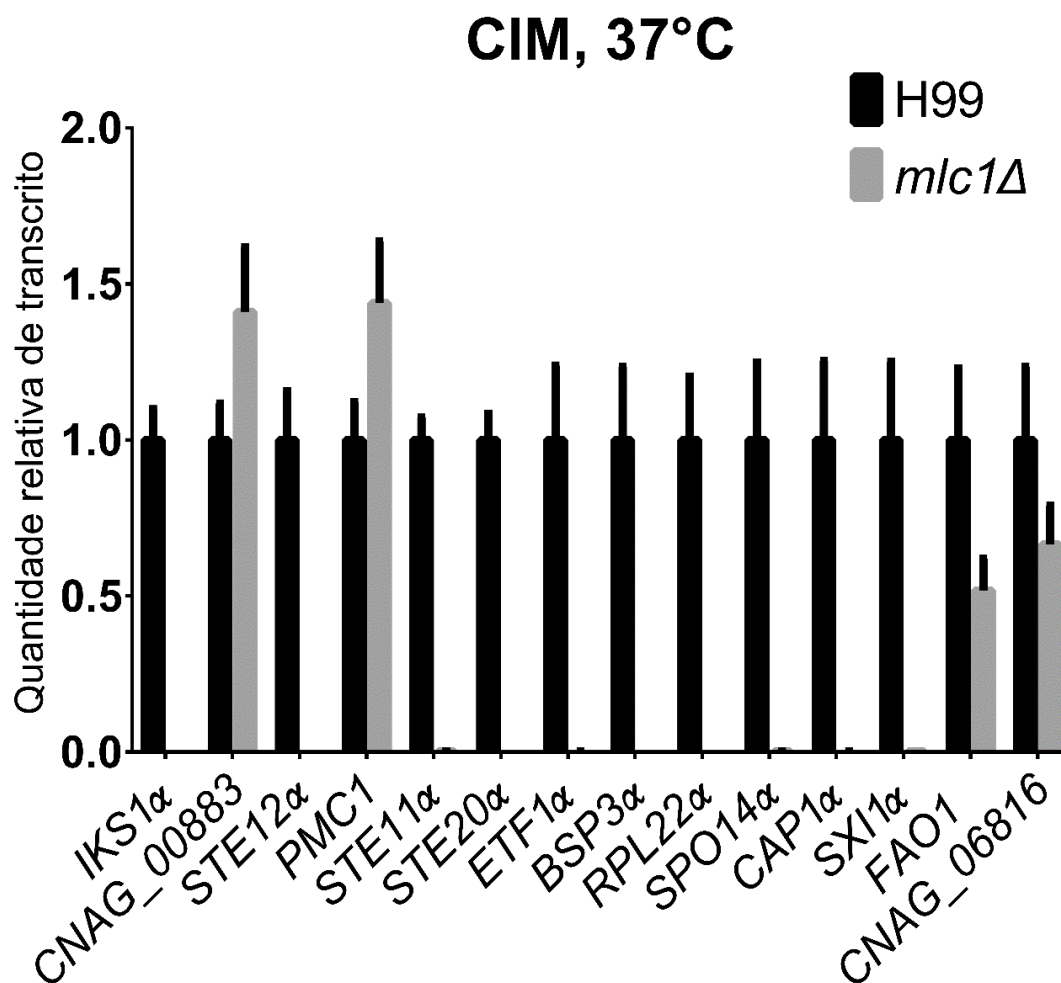


Figura 21. Validação, por PCR em tempo real, das taxas de expressão de transcritos indicados como diferenciais ao RNA-Seq. Os histogramas representam as quantidades de transcritos na cepa *mlc1* relativas à cepa H99. As barras são IC95%.

Em seguida, verificou-se se transcritos do *locus MAT α* estão suprimidos em outras condições de cultura. À figura 22, confirma-se que sim, em todas as condições testadas os genes se encontram várias ordens de magnitude reprimidos.

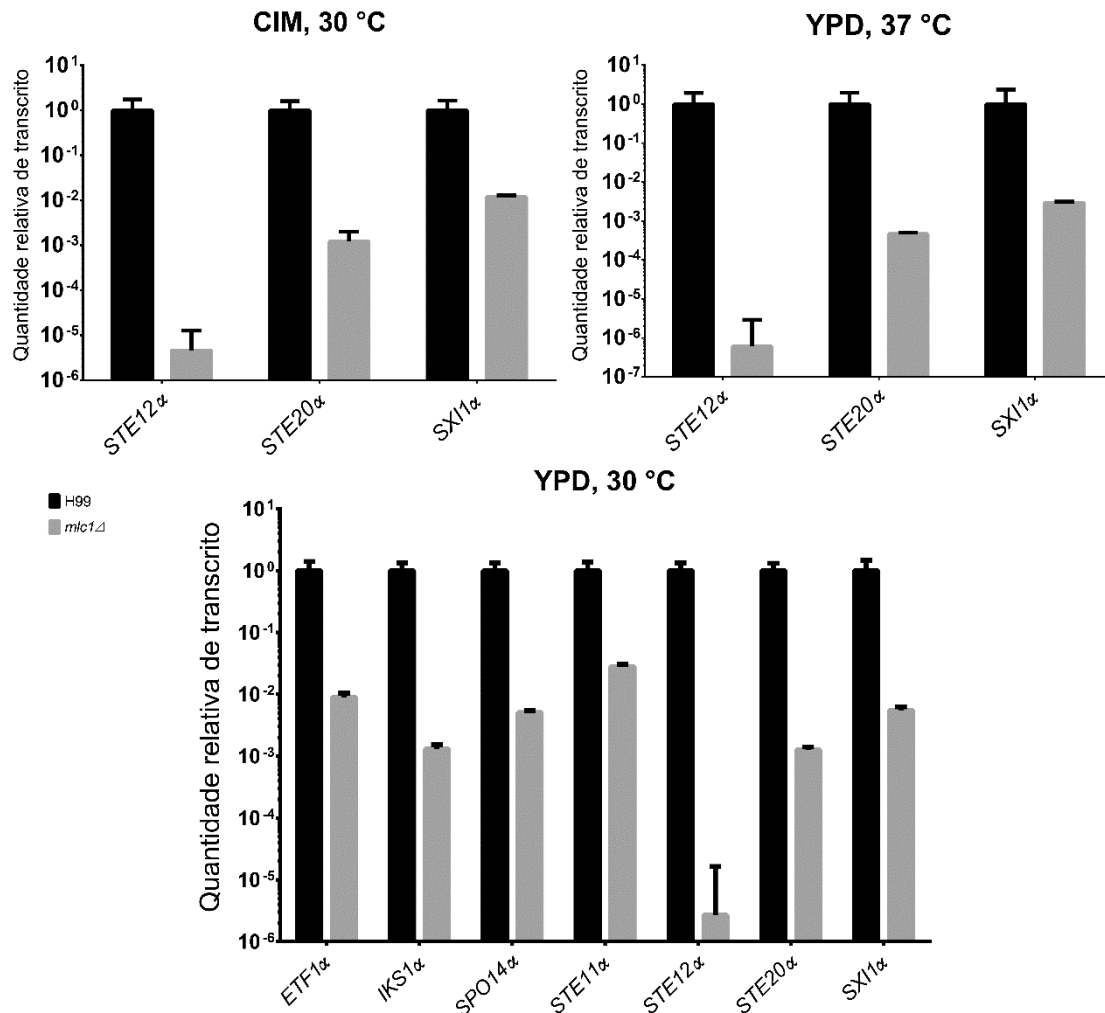


Figura 22. Confirmação por PCR em tempo real de que transcritos selecionados do *locus MAT α* se encontram reprimidos em todas as condições de cultura testadas. Note que a escala é logarítmica. A representação da quantidade de transcrito se deu como na figura 18.

O mutante *mlc1* não apresenta um defeito de acasalamento

Em vista dos resultados acima, que mostram que as ORFs mais diferenciais da cepa mutante se encontram no *locus MAT*, avaliou-se se os mutantes feitos a partir dos das cepas férteis KN99a e KN99 α (*mlc1a* e *mlc1 α*) apresentavam defeito de acasalamento, conforme ilustrado à figura 23. O acasalamento entre cepas

mutantes ocorre de forma temporal e morfológicamente indistinguível do acasalamento entre as cepas parentais.



Figura 23. Ensaio qualitativo de acasalamento. *Fileira superior*: todos os cruzamentos começaram a formar filamentos sexuais característicos do acasalamento após 72 horas em meio SLAD. *Fileira média*: aos vinte dias, o progresso da filamentação era equivalente em todos os acasalamentos. *Fileira inferior*: aos 26 dias, o aspecto das colônias em filamentação era igualmente similar.

Discussão

A perda do gene *MLC1*, o membro do ramo Gti1 da família Gti1/Pac2 em *C. neoformans*, resulta numa série de fenótipos concernentes à virulência e adaptação do patógeno ao hospedeiro, a saber: falha em induzir espessamento da cápsula em resposta a estímulos externos; defeito de crescimento e citocinese a 37 °C ou em meio CO₂-independente; déficit de sobrevivência no interior de macrófagos; avirulência em modelo murino de infecção; hipovirulência em modelo invertebrado a 30 °C, e avirulência a 37 °C. Além disso, a perda de *MLC1* resultou na expressão

diferencial de centenas de genes, com particular destaque para a quase completa supressão da maioria das ORFs codantes do *locus MAT*. Apesar do último achado, contudo, mutantes *mlc1* acasalam normalmente.

A cápsula de criptococo é a assinatura morfológica desse gênero de fungos, e um fator de virulência de extrema importância¹⁷. Exatamente por esse motivo, muito da pesquisa sobre o ciclo de vida e infecção desses patógenos têm sido com o fim de elucidar os mecanismos de síntese e montagem dela.

Recentemente, esses esforços culminaram no primeiro relato do uso de biologia dos sistemas para dissecar a fundo a via de regulação da síntese de cápsula em *C. neoformans*¹⁸. Os autores do estudo foram não apenas capazes de revalidar para a técnica que desenvolveram os fatores de transcrição previamente descritos como implicados no controle da cápsula, como descobriram vários outros. Além disso, eles foram capazes de hierarquizar os diferentes reguladores e determinar seu papel temporal na indução de cápsula. Trata-se do estudo mais abrangente sobre a regulação deste importante fator de virulência.

Entretanto, o gene *MLC1* não foi encontrado por eles. Isso é particularmente intrigante porque um dos genes revalidados⁷⁴ é justamente um integrante do *locus MAT α* , o gene *STE12 α* , que este trabalho demonstrou ser drasticamente suprimido na ausência da proteína Mlc1. O fator Ste12 α , segundo os autores do estudo¹⁸, seria um regulador de uma etapa intermediária da complexa malha de regulação que culmina na indução de cápsula.

Como a secreção de GXM é severamente reduzida no mutante, que é capaz de sintetizar uma cápsula basal, esses dados indicam que a perda de Mlc1 talvez não afete a via de síntese da cápsula (e, de fato, os transcritos correspondentes a enzimas da via de síntese dos açúcares ativados que são precursores dos polissacarídeos capsulares¹⁸ não apresentam expressão diferencial nas condições analisadas neste trabalho), e sim a secreção de componentes capsulares. Vias de secreção não-alternativas foram implicadas no processo de indução de cápsula⁷⁵.

Porém, se houvesse um defeito global na secreção vesicular no mutante *mlc1*, outros fatores de virulência secretados em vesículas, tais como melanina e urease^{76,77}, também seriam afetados. O mutante se melaniza e produz halos de urease e fosfolipase normalmente, o que indica que, caso o problema esteja na secreção de vesículas, ele provavelmente afeta apenas as vesículas implicadas na secreção de componentes capsulares, o que está de acordo com a observação prévia de que há várias subpopulações de vesículas⁷⁷.

O experimento de vídeo-microscopia mostra que, em CIM a 37 °C, o mutante *mlc1* apresenta defeito de citocinese. Um defeito semelhante, porém menos pronunciado, foi demonstrado para o mutante *ste20α*⁷⁸ a 39 °C. O mutante *mlc1* apresenta expressão diferencial de vários genes ontologicamente classificados como parte dos mecanismos de ciclo celular, organização do citoesqueleto e divisão celular, tais como cinesinas⁷⁹ e uma NEK cinase⁸⁰, que podem explicar o fenótipo observado. O fenótipo não se manifesta em YPD a 30 °C, e é muito menos pronunciado em YPD a 37 °C, o que indica que Mlc1 não é apenas um sensor de temperatura. Com efeito, não houve enriquecimento de categorias de resposta ao estresse térmico, e não se encontraram genes de chaperonas entre os diferenciais.

Os fenótipos de cápsula e virulência do mutante *mlc1* são verificados em condições de cultura a 37 °C e em camundongo, respectivamente. Isso sugeriria que a proteína Mlc1 seria um sensor térmico e, embora a possibilidade de que ela *também* responda a estímulos térmicos não possa ser descartada, os experimentos de crescimento não indicam ser esse o caso, visto que o mutante apresenta retardo também em CIM a 30 °C.

Além disso, as curvas de crescimento indicam que o mutante atinge a fase estacionária em densidades celulares mais baixas do que a cepa selvagem. Embora os dados não permitam determinar por que isso acontece, é possível que o mutante tenha problemas na adaptação a níveis mais baixos de nutrientes conforme o meio é consumido.

Vale notar, ainda, que no modelo de *G. mellonella*, o mutante retém alguma virulência quando a lagarta infectada é mantida a 30 °C, o que indica que o defeito de adaptação ao estresse térmico é parcialmente responsável pela perda de virulência no modelo murino e da lagarta a 37 °C.

A decisão de nomear a CNAG_01983 de Controlador do *locus MAT 1* fundamenta-se no fato de que mutantes de genes desse *locus*, já descritos na literatura, em conjunto respondem pela quase totalidade dos fenótipos que foram descritas neste trabalho. Além do defeito de citocinese do mutante *ste20α*, os seguintes fenótipos já foram relatados:

- i. Hipocapsularidade: no mutante *ste12α*⁷⁴;
- ii. Déficit de crescimento a temperatura mais alta: no mutante *ste20α*⁷⁸, mas apenas a 39 °C;
- iii. Hipovirulência: em *ste20α*⁷⁸ e *rum1α*⁴⁰, e no caso deste último, os autores também constataram queda na colonização pulmonar.

Vale ainda notar que os fenótipos de *mlc1* são mais pronunciados do que os dos mutantes de genes do *locus MAT* separadamente – o que é de se esperar se eles são regulados por Mlc1. Embora a persistência da cepa *mlc1* no cérebro não tenha sido relatada para os mutantes acima citados, ela também não foi testada pelos autores daqueles estudos. No mais, ela pode ser explicada por uma queda na taxa de produção de cápsula combinada com crescimento mais lento do fungo⁸¹.

Em suma, é válido postular que, embora a perda de Mlc1 resulte em mudanças no padrão transcricional para além do *locus MAT*, as variações de fenótipos resultantes derivam primariamente da repressão dos genes do dito *locus*.

Acasalamento e virulência são fenômenos evolutivamente distintos, porém que apresentam convergência em determinados contextos.

Os efeitos do acasalamento sobre a virulência são ambíguos. Por um lado, o acasalamento proporciona a patógenos a chance de adquirir, por recombinação durante a meiose, traços fenotípicos favoráveis à colonização do hospedeiro, ou à

resistência a agentes antimicrobianos⁸². Por outro, uma vez que um patógeno possua um conjunto de atributos de virulência e características metabólicas bem adequadas ao hospedeiro, recombinação e meiose podem perturbar esse equilíbrio pela introdução de traços genotípicos desfavoráveis. Nesse caso, a reprodução clonal favorece a preservação dos traços evolutivamente vantajosos⁸².

No caso de fungos, Nielsen e Heitman⁸² postulam que esses organismos precisam conciliar as vantagens da reprodução sexuada – aumento de variabilidade e adaptabilidade a ambientes diversos, assim como a produção de formas de disseminação ambiental, tais como esporos – com as vantagens da reprodução clonal – preservação de um genótipo adaptado a um ambiente pouco variável como o interior de um hospedeiro, livre de interferências produzidas por processos de recombinação que introduzam alelos menos favoráveis. Os autores notam que espécies predominantemente patogênicas tendem à clonalidade, enquanto que espécies predominantemente de vida livre tendem a exibir acasalamento com maior frequência⁸².

Por outro lado, os *sinais* que indicam o contato com o hospedeiro são qualitativamente semelhantes àqueles que indicam condições ambientais hostis (mudança de temperatura e disponibilidade de nutrientes, por exemplo). No primeiro caso, o patógeno responde com uma reprogramação metabólica, e por vezes morfogênica, que permite a infecção. No segundo, o organismo responde iniciando o acasalamento, que resulta em formas de dispersão (esporos) que permitem que o fungo escape daquele local para germinar em outro cujas condições sejam mais favoráveis⁸².

Não é surpresa, portanto, que o *locus MAT*, em *C. neoformans* e outros fungos⁸³ esteja implicado não apenas em acasalamento como em virulência. Porém, o mutante *mlc1* inicia o acasalamento normalmente, mesmo que em condições de crescimento vegetativo em diversos meios, os genes do *locus MAT* estejam reprimidos a ponto de o mutante apresentar fenótipos equivalentes ao de cepas

nocautes para genes do *locus*. Vários dos mutantes de genes do *locus MAT* descritos na literatura, tais como *SXI1α*⁸⁴, *STE11α*⁸⁵, *STE12α*⁷⁴ e *STE20α*⁷⁸, não são sequer capazes de gerar os filamentos diplóides associados ao acasalamento.

Assim, a proteína *Mlc1* é necessária para que o *locus MAT* desempenhe suas funções na virulência, mas não no acasalamento. O papel do *locus MAT* se revela como sendo estritamente regulado: os mesmos genes desempenham funções reguladoras (os genes *STE* compõem uma cascata de regulação e *SXI1α*, *STE12α* e *RUM1α* são fatores de transcrição) com desfechos distintos – a expressão de fatores de virulência ou o acasalamento – de acordo com o contexto, e o ramo da virulência está sob o comando de *Mlc1*.

Conforme dito à introdução, proteínas da família Gti1/Pac2 apresentam alto grau de especialização, de modo que espécies fúngicas próximas podem tê-las no comando de processos fisiológicos distintos. O fungo mais próximo de *C. neoformans* que possui um fator da família caracterizado é *U. maydis*⁵², um basidiomiceto cuja *Pac2* tem papel regulador no acasalamento – justamente um processo que *Mlc1* não influencia (nem, tampouco, ao que se sabe, *Liv3*^{38,54}). Sendo assim, não surpreende que os processos comandados por *Mlc1* – citocinese e crescimento sob condições de estresse e síntese de cápsula – não guardem similaridade, além do fato de serem processos morfogênicos – com os fenótipos regulados por esses fatores de transcrição nos demais fungos em que foram estudados, visto que são todos ascomicetos. Por outro lado, ainda que *Mlc1* não influencie o acasalamento, o fato de que pelo menos dois outros fatores da família o fazem^{41,43–45} sugere que também eles, e possivelmente outros, tenham influência sobre os *loci MAT* de suas respectivas espécies, embora essa possibilidade careça de investigação.

Conclusões e perspectivas

Ao estudar um gene da família Gti1/Pac2 em *C. neoformans*, nosso grupo descobriu uma conexão entre o *locus MAT* e a virulência que é independente das funções desse *locus* na reprodução sexuada do fungo.

Isso abre uma promissora avenida de investigação, pois as chances são elevadas de que genes regulados por Mlc1 estejam direta e especificamente implicados na expressão de fatores de virulência.

Em suma, o presente trabalho identificou e caracterizou o segundo membro da família Gti1/Pac2 em *C. neoformans*, e verificou que a proteína correspondente, Mlc1, é um fator de transcrição necessário para o espessamento da cápsula em resposta a estímulos externos, a citocinese em condições de estresse e a virulência do fungo. Mlc1 é necessário para a expressão da maior parte dos genes do *locus MAT*, mesmo em condições de crescimento vegetativo, embora não seja necessário para o acasalamento do fungo, o que sugere fortemente que a proteína regula a adaptação do criptococo ao hospedeiro via *locus MAT*.

Com base nas observações deste trabalho, os seguintes passos se encontram em desenvolvimento:

- i. Investigar os sítios de ligação de Mlc1, seja por ChIP-Seq ou pela abordagem iterativa de predição de sítios com base em dados de transcriptoma desenvolvida por Michael Brent e colaboradores⁸⁶;
- ii. Determinar o papel de Mlc1 no ciclo celular de criptococo, em vista dos defeitos de crescimento e citocinese observados;
- iii. Investigar o papel de Mlc1 na secreção de componentes capsulares e na via de secreção não-convencional como um todo;
- iv. Descobrir a via, ou vias, de sinalização que influenciam Mlc1;
- v. Identificar interactantes diretos de Mlc1;

- vi. Investigar a possibilidade de que Mlc1 module o estado de compactação da cromatina;
- vii. Investigar se Mlc1 não influencia etapas mais tardias do ciclo sexuado de *C. neoformans*;
- viii. Investigar se Mlc1 não é importante para a resistência de *C. neoformans* a predadores ambientais, tais como amebas.

Os achados do presente projeto indicam que o módulo regulador de Mlc1 inclui proteínas envolvidas em processos-chaves para a virulência (síntese de cápsula, sobrevivência e reprodução a 37 °C), de modo que os genes regulados por este fator de transcrição podem incluir alvos para futuras estratégias terapêuticas. Do ponto de vista de nosso entendimento sobre a biologia dos fungos, Mlc1 representa uma importante peça na evolução do *locus MAT* como um sensor de estresses ambientais e regulador da reprodução sexuada e da adaptação ao hospedeiro. O papel aqui descoberto foi uma surpresa, e não há motivos para crer que tenha sido a última que este fascinante fator de transcrição nos reserva.

Apêndice

Tabela I – iniciadores

Nome	Seqüência (5'→3')	Alvo	Uso
LF001	AACACCACACCAAGGAATCTG	Região 5' de <i>MLC1</i>	PCR de sobreposição, deleção e reconstituição de <i>MLC1</i> , geração da sonda para hibridação em membrana

Bibliografia

1. Nett, J. E. & Andes, D. R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infect. Dis. Clin. North Am.* (2015).
doi:10.1016/j.idc.2015.10.012
2. Albataineh, M. T., Sutton, D. A., Fothergill, A. W. & Wiederhold, N. P. Update from the Laboratory: Clinical Identification and Susceptibility Testing of Fungi and Trends in Antifungal Resistance. *Infect. Dis. Clin. North Am.* (2015).
doi:10.1016/j.idc.2015.10.014
3. McNeil, M. M. *et al.* Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 641–647 (2001).
4. Gigliotti, F., Limper, A. H. & Wright, T. Pneumocystis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**, a019828 (2014).
5. Turner, S. A. & Butler, G. The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**, a019778 (2014).
6. Sugui, J. A., Kwon-Chung, K. J., Juvvadi, P. R., Latgé, J.-P. & Steinbach, W. J. *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold Spring Harb Perspect Med* **5**, a019786 (2015).
7. Lin, X. & Heitman, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 69–105 (2006).
8. Pirofsky, L. & Casadevall, A. in *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast* (ASM Press, 2011).
9. Park, B. J. *et al.* Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS: *AIDS* **23**, 525–530 (2009).
10. Byrnes, E. J., Bartlett, K. H., Perfect, J. R. & Heitman, J. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. *Microbes and Infection* **13**, 895–907 (2011).

11. Maziarz, E. K. & Perfect, J. R. Cryptococcosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **30**, 179–206 (2016).
12. Rohatgi, S. & Pirofski, L.-A. Host immunity to *Cryptococcus neoformans*. *Future Microbiol* **10**, 565–581 (2015).
13. Hagen, F. *et al.* Ancient dispersal of the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon rainforest. *PLoS ONE* **8**, e71148 (2013).
14. May, R. C., Stone, N. R. H., Wiesner, D. L., Bicanic, T. & Nielsen, K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 106–117 (2016).
15. Cogliati, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica (Cairo)* **2013**, 675213 (2013).
16. Srikanta, D., Santiago-Tirado, F. H. & Doering, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. *Yeast* **31**, 47–60 (2014).
17. Janbon, G. & Doering, T. L. in *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast* (ASM Press, 2011).
18. Maier, E. J. *et al.* Model-driven mapping of transcriptional networks reveals the circuitry and dynamics of virulence regulation. *Genome Res.* **25**, 690–700 (2015).
19. Trofa, D., Casadevall, A. & Nosanchuk, J. D. in *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast* (ASM Press, 2011).
20. Fox, D. S., Djordjevic, J. T. & Sorrell, T. C. in *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast* (ASM Press, 2011).
21. Dromer, F. & Levitz, S. M. in *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast* (ASM Press, 2011).
22. Hsueh, Y.-P., Lin, X., Kwon-Chung, K. J. & Heitman, J. in *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast* (ASM Press, 2011).

23. Nielsen, K. *et al.* *Cryptococcus neoformans* {alpha} strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. *Infect. Immun.* **73**, 4922–4933 (2005).
24. Nielsen, K. *et al.* Interaction between genetic background and the mating-type locus in *Cryptococcus neoformans* virulence potential. *Genetics* **171**, 975–983 (2005).
25. Idnurm, A. *et al.* Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 753–764 (2005).
26. Steenbergen, J. N., Shuman, H. A. & Casadevall, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 15245–15250 (2001).
27. Mylonakis, E., Ausubel, F. M., Perfect, J. R., Heitman, J. & Calderwood, S. B. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 15675–15680 (2002).
28. Mylonakis, E. *et al.* *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect. Immun.* **73**, 3842–3850 (2005).
29. Derengowski, L. da S. *et al.* The transcriptional response of *Cryptococcus neoformans* to ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and macrophages provides insights into the evolutionary adaptation to the mammalian host. *Eukaryotic Cell* **12**, 761–774 (2013).
30. Hu, G. *et al.* Transcriptional regulation by protein kinase A in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog.* **3**, e42 (2007).
31. Cramer, K. L., Gerrald, Q. D., Nichols, C. B., Price, M. S. & Alspaugh, J. A. Transcription factor Nrg1 mediates capsule formation, stress response, and pathogenesis in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* **5**, 1147–1156 (2006).

32. Nichols, C. B., Perfect, Z. H. & Alspaugh, J. A. A Ras1-Cdc24 signal transduction pathway mediates thermotolerance in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* **63**, 1118–1130 (2007).
33. Idnurm, A., Bahn, Y.-S., Shen, W.-C., Rutherford, J. C. & Mühlischlegel, F. A. in *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast* (ASM Press, 2011).
34. Kraus, P. R., Fox, D. S., Cox, G. M. & Heitman, J. The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. *Mol. Microbiol.* **48**, 1377–1387 (2003).
35. Odom, A. *et al.* Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J.* **16**, 2576–2589 (1997).
36. Ost, K. S., O’Meara, T. R., Huda, N., Esher, S. K. & Alspaugh, J. A. The *Cryptococcus neoformans* alkaline response pathway: identification of a novel rim pathway activator. *PLoS Genet.* **11**, e1005159 (2015).
37. Nguyen, V. Q. & Sil, A. Temperature-induced switch to the pathogenic yeast form of *Histoplasma capsulatum* requires Ryp1, a conserved transcriptional regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 4880–4885 (2008).
38. Liu, O. W. *et al.* Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Cell* **135**, 174–188 (2008).
39. O’Meara, T. R. *et al.* The *Cryptococcus neoformans* Rim101 transcription factor directly regulates genes required for adaptation to the host. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 673–684 (2014).
40. Jung, K.-W. *et al.* Systematic functional profiling of transcription factor networks in *Cryptococcus neoformans*. *Nat Commun* **6**, 6757 (2015).
41. Kunitomo, H., Sugimoto, A., Wilkinson, C. R. & Yamamoto, M. *Schizosaccharomyces pombe* pac2⁺ controls the onset of sexual development via a pathway independent of the cAMP cascade. *Curr. Genet.* **28**, 32–38 (1995).

42. Caspari, T. Onset of gluconate-H⁺ symport in *Schizosaccharomyces pombe* is regulated by the kinases Wis1 and Pka1, and requires the gti1+ gene product. *J. Cell. Sci.* **110 (Pt 20)**, 2599–2608 (1997).
43. Huang, G. *et al.* Bistable expression of WOR1, a master regulator of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 12813–12818 (2006).
44. Zordan, R. E., Galgoczy, D. J. & Johnson, A. D. Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 12807–12812 (2006).
45. Srikantha, T. *et al.* TOS9 regulates white-opaque switching in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **5**, 1674–1687 (2006).
46. Cain, C. W., Lohse, M. B., Homann, O. R., Sil, A. & Johnson, A. D. A conserved transcriptional regulator governs fungal morphology in widely diverged species. *Genetics* **190**, 511–521 (2012).
47. 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.* **11**, e1001614 (2013).
48. Chen, Y. *et al.* Shared and distinct functions of two Gti1/Pac2 family proteins in growth, morphogenesis and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *Environ. Microbiol.* **16**, 788–801 (2014).
49. Michielse, C. B. *et al.* The nuclear protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* is required for parasitic growth. *PLoS Pathog.* **5**, e1000637 (2009).
50. Michielse, C. B. *et al.* The *Botrytis cinerea* Reg1 protein, a putative transcriptional regulator, is required for pathogenicity, conidiogenesis, and the production of secondary metabolites. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 1074–1085 (2011).

51. Lohse, M. B., Zordan, R. E., Cain, C. W. & Johnson, A. D. Distinct class of DNA-binding domains is exemplified by a master regulator of phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 14105–14110 (2010).
52. Elías-Villalobos, A., Fernández-Álvarez, A. & Ibeas, J. I. The general transcriptional repressor Tup1 is required for dimorphism and virulence in a fungal plant pathogen. *PLoS Pathog.* **7**, e1002235 (2011).
53. Nemecek, J. C., Wüthrich, M. & Klein, B. S. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science* **312**, 583–588 (2006).
54. Madhani, H. D. *et al.* A peptide-based quorum sensing system required for fungal virulence. in *Special Issue: 9th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis* **57, Supp. 1**, 23 (2014).
55. Toffaletti, D. L., Rude, T. H., Johnston, S. A., Durack, D. T. & Perfect, J. R. Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *J. Bacteriol.* **175**, 1405–1411 (1993).
56. Walton, F. J., Idnurm, A. & Heitman, J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* **57**, 1381–1396 (2005).
57. Fraser, J. A., Subaran, R. L., Nichols, C. B. & Heitman, J. Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. *Eukaryotic Cell* **2**, 1036–1045 (2003).
58. Drivinya, A., Shimizu, K. & Takeo, K. Construction of a complete URA5 deletion strain of a human pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* **45**, 1–6 (2004).
59. Pitkin, J. W., Panaccione, D. G. & Walton, J. D. A putative cyclic peptide efflux pump encoded by the TOXA gene of the plant-pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. *Microbiology (Reading, Engl.)* **142 (Pt 6)**, 1557–1565 (1996).

60. Davidson, R. C. *et al.* A PCR-based strategy to generate integrative targeting alleles with large regions of homology. *Microbiology (Reading, Engl.)* **148**, 2607–2615 (2002).
61. Zaragoza, O. & Casadevall, A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol Proced Online* **6**, 10–15 (2004).
62. Nicola, A. M. & Casadevall, A. In vitro measurement of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by macrophages. *Methods Mol. Biol.* **844**, 189–197 (2012).
63. Zebedee, S. L. *et al.* Mouse-human immunoglobulin G1 chimeric antibodies with activities against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1507–1514 (1994).
64. Leongson, K. *et al.* Altered Immune Response Differentially Enhances Susceptibility to *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Infection in Mice Expressing the HIV-1 Transgene. *Infect Immun* **81**, 1100–1113 (2013).
65. Quintin, J. *et al.* Differential role of NK cells against *Candida albicans* infection in immunocompetent or immunocompromised mice. *Eur. J. Immunol.* **44**, 2405–2414 (2014).
66. Gilbert, N. M. *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.* **76**, 517–534 (2010).
67. García-Rivera, J., Chang, Y. C., Kwon-Chung, K. J. & Casadevall, A. *Cryptococcus neoformans* CAP59 (or Cap59p) is involved in the extracellular trafficking of capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryotic Cell* **3**, 385–392 (2004).
68. Kim, D. *et al.* TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology* **14**, R36 (2013).
69. Trapnell, C. *et al.* Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols* **7**, 562–578 (2012).

70. Conesa, A. *et al.* Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**, 3674–3676 (2005).
71. O’Meara, T. R. *et al.* Interaction of *Cryptococcus neoformans* Rim101 and Protein Kinase A Regulates Capsule. *PLoS Pathog* **6**, e1000776 (2010).
72. Puntervoll, P. *et al.* ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3625–3630 (2003).
73. Fan, W., Kraus, P. R., Boly, M.-J. & Heitman, J. *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. *Eukaryotic Cell* **4**, 1420–1433 (2005).
74. Yue, C. *et al.* The STE12alpha homolog is required for haploid filamentation but largely dispensable for mating and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* **153**, 1601–1615 (1999).
75. Rodrigues, M. L. *et al.* Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryotic Cell* **6**, 48–59 (2007).
76. Eisenman, H. C., Frases, S., Nicola, A. M., Rodrigues, M. L. & Casadevall, A. Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology (Reading, Engl.)* **155**, 3860–3867 (2009).
77. Rodrigues, M. L. *et al.* Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell* **7**, 58–67 (2008).
78. Wang, P. *et al.* Mating-type-specific and nonspecific PAK kinases play shared and divergent roles in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* **1**, 257–272 (2002).
79. Wordeman, L. How kinesin motor proteins drive mitotic spindle function: Lessons from molecular assays. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 260–268 (2010).

80. Fry, A. M., O'Regan, L., Sabir, S. R. & Bayliss, R. Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases. *J. Cell. Sci.* **125**, 4423–4433 (2012).
81. Pool, A., Lowder, L., Wu, Y., Forrester, K. & Rumbaugh, J. Neurovirulence of *Cryptococcus neoformans* determined by time course of capsule accumulation and total volume of capsule in the brain. *J. Neurovirol.* **19**, 228–238 (2013).
82. Nielsen, K. & Heitman, J. Sex and virulence of human pathogenic fungi. *Adv. Genet.* **57**, 143–173 (2007).
83. Zheng, Q. *et al.* The MAT locus genes play different roles in sexual reproduction and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE* **8**, e66980 (2013).
84. Hull, C. M., Davidson, R. C. & Heitman, J. Cell identity and sexual development in *Cryptococcus neoformans* are controlled by the mating-type-specific homeodomain protein Sxi1alpha. *Genes Dev.* **16**, 3046–3060 (2002).
85. Davidson, R. C., Nichols, C. B., Cox, G. M., Perfect, J. R. & 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.* **49**, 469–485 (2003).
86. Haynes, B. C. *et al.* Mapping functional transcription factor networks from gene expression data. *Genome Res.* **23**, 1319–1328 (2013).
87. Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. Epidemiology of Invasive Mycoses in North America. *Critical Reviews in Microbiology* **36**, 1–53 (2010).
88. Pyrgos, V., Seitz, A. E., Steiner, C. A., Prevots, D. R. & Williamson, P. R. Epidemiology of cryptococcal meningitis in the US: 1997-2009. *PLoS ONE* **8**, e56269 (2013).
89. Wormley, F. L., Heinrich, G., Miller, J. L., Perfect, J. R. & Cox, G. M. Identification and characterization of an SKN7 homologue in *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **73**, 5022–5030 (2005).
90. Moye-Rowley, W. S. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryotic Cell* **2**, 381–389 (2003).

91. Govindaraghavan, M., Lad, A. A. & Osmani, S. A. The NIMA kinase is required to execute stage-specific mitotic functions after initiation of mitosis. *Eukaryotic Cell* **13**, 99–109 (2014).
92. Dresios, J., Derkatch, I. L., Liebman, S. W. & Synetos, D. Yeast ribosomal protein L24 affects the kinetics of protein synthesis and ribosomal protein L39 improves translational accuracy, while mutants lacking both remain viable. *Biochemistry* **39**, 7236–7244 (2000).
93. Clarke, D. L., Woodlee, G. L., McClelland, C. M., Seymour, T. S. & Wickes, B. L. The *Cryptococcus neoformans* STE11alpha gene is similar to other fungal mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) genes but is mating type specific. *Mol. Microbiol.* **40**, 200–213 (2001).
94. Pierini, L. M. & Doering, T. L. Spatial and temporal sequence of capsule construction in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* **41**, 105–115 (2001).
95. Zaragoza, O., Telzak, A., Bryan, R. A., Dadachova, E. & Casadevall, A. The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding. *Mol. Microbiol.* **59**, 67–83 (2006).
96. MacGill, T. C., MacGill, R. S., Casadevall, A. & Kozel, T. R. Biological correlates of capsular (quellung) reactions of *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* **164**, 4835–4842 (2000).
97. Mukherjee, J., Cleare, W. & Casadevall, A. Monoclonal antibody mediated capsular reactions (Quellung) in *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol. Methods* **184**, 139–143 (1995).
98. Cordero, R. J. B., Bergman, A. & Casadevall, A. Temporal behavior of capsule enlargement by *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* **12**, 1383–1388 (2013).
99. García-Rodas, R. *et al.* Capsule growth in *Cryptococcus neoformans* is coordinated with cell cycle progression. *MBio* **5**, e00945–00914 (2014).

100. Cordero, R. J. B. *et al.* Antibody binding to *Cryptococcus neoformans* impairs budding by altering capsular mechanical properties. *J. Immunol.* **190**, 317–323 (2013).
101. McClelland, E. E., Nicola, A. M., Prados-Rosales, R. & Casadevall, A. Ab binding alters gene expression in *Cryptococcus neoformans* and directly modulates fungal metabolism. *J. Clin. Invest.* **120**, 1355–1361 (2010).