



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**O reparo de DNA e a virulência fúngica: estudo dos genes
*APN1, APN2 e XPC de *Cryptococcus neoformans*.***

RAYSSA KARLA DE MEDEIROS OLIVEIRA

Orientadora: PROF^a. DR^a ILDINETE SILVA PEREIRA

Co-orientadora: PROF^a DR^a LARISSA FERNANDES MATOS

Brasília, Janeiro de 2022.

RAYSSA KARLA DE MEDEIROS OLIVEIRA

**O reparo de DNA e a virulência fúngica: estudo dos genes
*APN1, APN2 e XPC de *Cryptococcus neoformans*.***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Biologia Molecular.

Brasília, Janeiro, 2022

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia Molecular da Universidade de Brasília – UnB. Este trabalho recebeu apoio financeiro dos órgãos CAPES e FAP-DF.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ildinete Silva Pereira

“Se você se dedica aos estudos, terá escapado de todo desgosto da vida, não ansiará pela chegada da noite por estar cansado da luz, nem será enfadonho para si mesmo ou inútil aos outros; atrairá amizades e aqueles que se reunirem à sua volta serão os mais excelentes.”

Sêneca

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo Da Vinci

“Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”

Sir Isaac Newton

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, Verdade Suprema, causa primária de todas as coisas, pela vida, saúde e felicidade que me permitiram chegar até aqui.

Agradeço a minha mãe Gracilene pelo exemplo que me arrastou como um vortex ao estudo e desenvolvimento acadêmico e pessoal. À minha mãe Maria por estar presente sempre que precisei, deixando sua casa e rotina para me auxiliar quando do nascimento da minha filha, curso de formação e especializações. Aos meus irmãos Laryssa e Arthur por me apoiarem emocionalmente sempre que precisei desabafar. Vocês tornaram a distância Brasília-Natal a menor possível.

Agradeço ao meu ex-companheiro e pai da minha filha, Tauame, por estar comigo desde a minha graduação até o mestrado e doutorado, me auxiliando física, mental e emocionalmente. Não estamos juntos mas para sempre estará presente nas memórias concretizadas em monografia, dissertação, artigos e nesta tese. Agradeço à minha filha querida e amada, por ser uma criança tão doce e compreensível por, mesmo sem entender a importância dos meus passos para longe, sempre confiar no meu retorno à ela. O amor que tenho por você filha, me deu forças para concluir e iniciar vários projetos, e depois de você, tudo que faço tem um pedaço seu, por você, para você, e com você. Sempre!

Às professoras Ildinete Silva-Pereira e Larissa Fernandes Matos por serem orientadoras tão fantásticas. Cada uma da sua maneira, foram indispensáveis ao desenvolvimento deste trabalho. Desde a confiança da professora Ildinete no início de um projeto tão diferente, ao acompanhamento firme da professora Larissa, durante todas as redações acadêmicas e discussão de resultados. Também pela paciência e compreensão em relação aos percalços que enfrentei para administrar tantos acontecimentos profissionais e pessoais, com o desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço também ao professor Marcio Poças por ceder de seu tempo para somar seus conhecimentos na discussão dos resultados obtidos neste trabalho.

Aos colegas do laboratório que sempre tiveram muito respeito e paciência com o meu jeito mais retraído de ser. Por me auxiliarem sempre que necessário, seja com o preparo de um meio de cultura, até discussão e execução de experimentos quando eu não os pude realizar. Um agradecimento especial ao Fabian Hurtado, Fernanda Fonseca e Kunal Hajan por estarem ao meu lado durante o processo de produção de dados desta tese. Aos alunos de Iniciação científica Pedro Henrique e Luiza Lassi pelas risadas

durante as várias horas que passávamos preparando placas no fluxo e por serem tão excelentes alunos.

Aos amigos Bombeiros Militares, em especial aos guerreiros da ala alfa do 18º GBM – Santa Maria, que me deram todo o incentivo e suporte para conclusão da redação deste trabalho (e artigo), mesmo sendo uma área por eles desconhecida. Agradeço por me incentivarem aos estudos e valorizarem a construção do meu currículo, mesmo fora do Corpo de Bombeiros.

À CAPES e FAP-DF pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente para este trabalho, meu muito obrigada. Há um pedaço de cada um de vocês nestas palavras.

Sumário

| | |
|--|-----------|
| 1. Introdução..... | 25 |
| 1.1. <i>C. neoformans</i> | 26 |
| 1.2. Atributos de virulência de <i>C. neoformans</i> | 28 |
| 1.3. Mecanismos de reparo de DNA..... | 32 |
| 1.4. As vias BER e NER em fungos | 37 |
| 1.5. As AP-endonucleases | 43 |
| 2. Justificativa..... | 46 |
| 3. Objetivo geral e específicos..... | 47 |
| 4. Materiais e métodos..... | 48 |
| 4.1. Linhagens | 48 |
| 4.2. Anotação, classificação e seleção dos genes de vias de reparo de <i>C. neoformans</i> . 48 | |
| 4.3. Construção de cepas de fungos deletadas para genes de reparo de DNA. | 49 |
| 4.4. Extração de DNA genômico..... | 52 |
| 4.5. Confirmação da deleção e reconstituição dos <i>loci APN1, APN2</i> e <i>XPC</i> por PCR e Southern Blot..... | 53 |
| 4.6. Curva de crescimento | 55 |
| 4.7. Avaliação fenotípica dos mutantes..... | 55 |
| 4.8. Análise de sobrevivência | 57 |
| 4.9. Teste de crescimento na presença de H ₂ O ₂ | 57 |
| 4.10. Ensaio de fagocitose <i>in vitro</i> | 58 |
| 4.11. Teste de virulência em <i>Galleria mellonella</i> | 59 |
| 4.12. Ensaio de susceptibilidade à drogas genotóxicas | 59 |
| 4.13. Ensaio de susceptibilidade à antibióticos..... | 61 |
| 4.14. Análises estatísticas | 62 |
| Capítulo I | 63 |
| 5. Resultados..... | 64 |

| | |
|--|----|
| 5.1. A proteína hipotética Apn2 de <i>C. neoformans</i> pertence à família das APendonucleases Xth e possui domínios multifuncionais. | 64 |
| 5.2. A proteína Apn2 predita de <i>C. neoformans</i> apresenta domínios proteicos associados à atividade de fator de transcrição. | 67 |
| 5.3. A proteína Apn2 de <i>C. neoformans</i> possui um cluster de cisteínas em posição semelhante ao cluster redox-ativo da APE1 humana | 70 |
| 5.4. Geração e confirmação de mutantes da via BER | 73 |
| 5.4. Mutantes <i>apn</i> não apresentam sensibilidade a agentes estressores osmóticos ou de parede celular quando cultivados em meio sólido..... | 76 |
| 5.5. Mutantes <i>apn2Δ</i> e <i>apn1Δapn2Δ</i> apresentam alta sensibilidade à radiação UV.. | 81 |
| 5.1. Mutantes BER apresentam sensibilidade dose dependente à exposição com os agentes MMS e EMS em altas concentrações. | 85 |
| 5.2. <i>APN2</i> é importante para a resistência a drogas antifúngicas | 87 |
| 5.3. A deleção de genes <i>APN</i> promove a redução das concentrações inibitórias mínimas de drogas antifúngicas. | 88 |
| 5.4. A inibição do reconhecimento de sítios abásicos pela Metoxiamina aumenta o efeito fungicida de Anfotericina B | 90 |
| 5.5. Inibição de sítios AP pela MX aumenta a sensibilidade de <i>C. neoformans</i> aos danos causados por H ₂ O ₂ | 92 |
| 5.6. Deleção de <i>APN1</i> e <i>APN2</i> aumenta a sensibilidade aos danos causados pela exposição ao antibiótico Zeocina. | 93 |
| 5.7. Deleção de <i>Apn1</i> e <i>Apn2</i> resulta em aumento da fragmentação do DNA induzida pela exposição à Zeocina..... | 93 |
| 5.8. Os genes <i>APN1</i> e <i>APN2</i> não interferem na produção de urease..... | 95 |
| 5.9. Deleção de <i>APN1</i> induz aumento na produção de fosfolipase | 96 |
| 5.10. A deleção de <i>APN2</i> retarda a produção de melanina por <i>C. neoformans</i> | 96 |
| 5.11. A deleção de genes <i>APN</i> não interferem na produção de cápsula por <i>C. neoformans</i> | 97 |
| 5.12. A redução na produção de melanina é decorrente do bloqueio do reparo de sítios abásicos nos mutantes <i>apn2Δ</i> e <i>apn1Δapn2Δ</i> | 98 |

| | |
|---|-----|
| 5.13. Deleção dos genes <i>APN1</i> e <i>APN2</i> compromete a sobrevivência de <i>C. neoformans</i> no interior de macrófagos. | 102 |
| 5.14. A deleção de genes <i>APN</i> não induz efeitos significativos em modelo de infecção em <i>Galleria mellonella</i> | 103 |
| 1. Introduction | 107 |
| 2. Materials and Methods | 109 |
| 2.1. Strain Maintenance | 109 |
| 2.2. Phylogenetic Analysis of the Predicted <i>C. neoformans</i> Apn1 and Apn2 Proteins | 109 |
| 2.3. Disruption of the APN1- and APN2-Like Genes | 109 |
| 2.4. Phenotype Assays | 110 |
| 2.5. Growth Curve Analysis | 110 |
| 2.6. Evaluation of the Yeast Cells' Resistance to Genotoxic Stress..... | 110 |
| 2.7. MIC Determination Assays | 111 |
| 2.8. Evaluation of Drug Interactions | 112 |
| 2.9. In Vitro Phagocytosis Assays | 112 |
| 2.9.1. Ethics Statement | 112 |
| 2.9.2. Infection of Bone Marrow-Derived Macrophages | 112 |
| 2.9.3. Phagocytosis Assay | 113 |
| 2.10. Wax Moth Larvae Infection | 113 |
| 2.11. Statistical Analyses..... | 114 |
| 3. Results | 114 |
| 3.1. Apn2-Like <i>C. neoformans</i> is an ExoIII/Ape1 Member of the AP Endonucleases Family..... | 114 |
| 3.2. <i>apn1</i> Δ , <i>apn2</i> Δ and <i>apn1</i> Δ <i>apn2</i> Δ Mutant Strains Do Not Differ from the Parental Strain Regarding Osmotic or Oxidative Stress Sensitivity..... | 116 |
| 3.3. <i>C. neoformans</i> APN1 and APN2-Like Genes Are Involved in the Repair of DNA Radiation-Induced Lesions | 116 |

| | |
|---|-----|
| 3.4. The Putative Apn2 Endonuclease Is Involved in Processing Alkylation-Induced DNA Damage in <i>C. neoformans</i> | 117 |
| 3.5. The Deletion of APN-Like Genes Results in Increased Sensitivity to Zeocin and DNA Fragmentation | 118 |
| 3.6. The Inhibition of Recognition of Abasic Sites By Methoxy-amine Enhances the Fungicidal Effect of Amphotericin B | 119 |
| 3.7. The CnApn1 and CnApn2-Like Sequences Are Required for the Production of Melanin..... | 121 |
| 3.8. The Recognition and Correction of Abasic Sites in DNA is Required for Proper Melanin Production by <i>C. Neoformans</i> | 122 |
| 3.9. Predicted <i>C. neoformans</i> Apn1 and Apn2 Proteins Influence Phagocytosis and Fungal Survival within Macrophages In Vitro | 124 |
| 3.10. Deletion of APN Genes Provokes Minor Effects in the Wax Moth Larva Model of Infection | 124 |
| 4. Discussion..... | 126 |
| 5. Conclusions | 129 |
| References | 131 |
| 6. Introdução..... | 136 |
| 7. Resultados..... | 138 |
| 7.1. O gene <i>XPC</i> de <i>C. neoformans</i> codifica uma proteína semelhante à Rad4 de <i>S. cerevisiae</i> | 138 |
| 7.2. O mutante <i>xpcΔ</i> apresenta sensibilidade à drogas genotóxicas e ao estresse oxidativo..... | 139 |
| 7.3. O Mutante <i>xpcΔ</i> apresenta sensibilidade ao estresse oxidativo | 140 |
| 7.4. Deleção do gene <i>XPC</i> compromete a produção de fosfolipase mas não interfere no acúmulo de melanina em <i>C. neoformans</i> | 143 |
| 7.5. Deleção do gene <i>XPC</i> não interfere no processo de fagocitose por macrófagos. | 144 |
| 8. Discussão..... | 146 |

| | |
|---------------------|-----|
| 9. Conclusão | 148 |
| 11. Apêndices | 172 |

RESUMO

Microrganismos patogênicos são expostos a uma série de estímulos que podem danificar o DNA durante a interação com o sistema imunológico do hospedeiro. A sobrevivência microbiana nesta situação depende de um equilíbrio delicado entre a manutenção da integridade do DNA e a adaptabilidade fornecida pelas mutações. Neste estudo, investigamos a associação da resposta de reparo do DNA com a virulência de *Cryptococcus neoformans*, um basidiomiceto que causa meningoencefalite com risco de vida em indivíduos imunocomprometidos. Nos concentramos na caracterização dos genes putativos de *C. neoformans* APN1 e APN2, com o objetivo de avaliar um possível papel das endonucleases apurínicas / apirimidínicas (AP) 1 e 2 preditas da via de reparo por excisão de base (BER) na resposta de *C. neoformans* a condições de estresse e virulência. Nossos resultados demonstraram o envolvimento das endonucleases AP Apn1 e Apn2 na resposta celular ao dano ao DNA induzido por alcilação e radiação UV, na produção de melanina, na tolerância a drogas e na virulência de *C. neoformans in vivo*. Também apontamos o potencial uso do inibidor de reparo de DNA metoxiamina em combinação com drogas antifúngicas convencionais, para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas contra esse patógeno fúngico humano. Nós estudamos também o gene XPC/Rad4 de *C. neoformans* e o impacto que o produto proteico codificado tem na virulência de *C. neoformans*. Nós demonstramos que XPC está envolvida na morfologia de *C. neoformans* em resposta ao estresse e a deleção do gene reduz significativamente a produção de fosfolipase pelo fungo. Este trabalho fornece novas informações sobre a resposta ao dano ao DNA do fungo patogênico *C. neoformans*.

Palavras-chave: Reparo de DNA; BER; Reparo por excisão de Bases; Ap-
endonucleases; metoxiamina.

ABSTRACT

Pathogenic microbes are exposed to a number of potential DNA-damaging stimuli during interaction with the host immune system. Microbial survival in this situation depends on a fine balance between the maintenance of DNA integrity and the adaptability provided by mutations. In this study, we investigated the association of the DNA repair response with the virulence of *Cryptococcus neoformans*, a basidiomycete that causes life-threatening meningoencephalitis in immunocompromised individuals. We focused on the characterization of *C. neoformans* *APN1* and *APN2* putative genes, aiming to evaluate a possible role of the predicted Apurinic/apyrimidinic (AP) endonucleases 1 and 2 of the base excision repair (BER) pathway on *C. neoformans* response to stress conditions and virulence. Our results demonstrated the involvement of the putative AP-endonucleases *Apn1* and *Apn2* in the cellular response to DNA damage induced by alkylation and by UV radiation, in melanin production, in tolerance to drugs and in virulence of *C. neoformans* in vivo. We also pointed out the potential use of DNA repair inhibitor methoxy-amine in combination with conventional antifungal drugs, for the development of new therapeutic approaches against this human fungal pathogen. We also studied the *C. neoformans* *XPC/Rad4* gene and the impact that the encoded protein product has on *C. neoformans* virulence. We demonstrate that *XPC* is involved in the morphogenesis of *C. neoformans* in response to stress and gene deletion significantly reduces phospholipase production by the fungus. This work provides new information about the DNA damage response of the highly important pathogenic fungus *C. neoformans*.

Keywords: DNA repair; BER; Base Excision Repair; AP-endonuclease; Methoxyamine;

Lista de Abreviaturas

| | |
|--------|--|
| AP- | Apurínico/apirimidínico |
| BER | Base Excision Repair – Reparo por excisão de bases |
| EMS | Etilmetano sulfonato |
| HIV | – Human immunodeficiency virus |
| HU | Hidroxiurea |
| L-Dopa | - L-3,4-dihydroxyphenylalanine |
| MAT | – <i>Mating type locus</i> |
| MM | Meio mínimo |
| MMS | Metilmetano sulfonato |
| MOI - | <i>Multiplicity of infection</i> |
| MX | Metoxiamina |
| NER | Nucleotide Excision Repair – Reparo por excisão de nucleotídeos |
| PBS | - <i>Phosphate buffered saline</i> (Solução salina tamponada com fostato). |
| PCR | Reação em cadeia de Polimerase |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia |
| UV | Ultra violeta |
| YNB | Meio para leveduras baseado em nitrogênio |
| YPD | Meio para leveduras baseado em carbono |

Lista de Figuras

- Figura 1** Infecção por *Cryptococcus*. As células de *Cryptococcus* existem no ambiente associando-se a vários nichos, incluindo pássaros, solo e plantas. Os esporos inalados por humanos podem entrar nos pulmões e causar infecção pulmonar. As células fúngicas também podem ser disseminadas para o sistema nervoso central (SNC) e causar meningite fúngica. Adaptado Xue et al., 2012. 27
- Figura 2.** Especificidade das vias de reparo de DNA. Representação esquemática da interação entre agentes causadores de danos no DNA, tipos de lesões geradas e as vias de reparo responsáveis por cada processo. Conexões em amarelo representam anormalidades no pareamento. BER- Reparo por excisão de bases; NER- Reparo por Excisão de nucleotídeos; DSBR- reparo de quebra de dupla fita; MMR- reparo de *mismatch*. Adaptado (Alexander, Kim, and Walker 2010)..... 34
- Figura 3.** A via de BER de *S. cerevisiae*. Os sítios AP (“O” vermelho) são gerados por perda espontânea de base ou por atividade de uma N-glicosilase no DNA. Apn1 e Apn2 cortam o *backbone* na porção 5' de um sítio AP para iniciar o caminho principal para o reparo; o 5'-dRP resultante é removido pela endonuclease Rad27 5'-flap. O processamento do sítio AP também pode ser iniciado pela Ntg1 ou Ntg2 liase, que cliva a fita na porção 3' da lesão. O 3'-dRP resultante pode ser removido pela atividade 3'-diesterase de Apn1 / Apn2 ou como parte de um oligonucleotídeo gerado por Rad1-Rad10. Finalmente, a lacuna é preenchida pela DNA Pol ϵ , e a estrutura é selada por DNA ligase 1. Adaptada de (Boiteux and Jinks-Robertson 2013a)..... 39
- Figura 4.** Representação esquemática das etapas para formação dos cassetes para deleção de via BER. A- Fragmentos e primers para deleção do gene *APN2*; B- Fragmentos e primers para deleção do gene *APN1*. NATnurseotricina; HPH-higromicina; C) Fragmentos para deleção do gene *XPC*. 50
- Figura 5** Representação esquemática dos sítios de reconhecimento e clivagem das enzimas Sall (A) e StuI. (B). As enzimas foram usadas para digestão do DNA e confirmação da deleção de *APN1* através da técnica de hibridação de sondas por Southern Blot. Os sítios são identificados pelas pontas das setas..... 54
- Figura 6** Análise comparativa de sequências preditas de aminoácidos das proteínas Apurinica/apirimidinica endonucleases (Apns). As sequências de nucleotídeos dos genes *APN1* (CNAG_05468) e *APN2* (CNAG_04268) de *C. neoformans* foram utilizadas para análises por Blastp. **A)** Resultados de alinhamento de sequências deduzidas de

aminoácidos das proteínas Apn1 de *C. albicans*, *S. pombe*, *S. cerevisiae* e *E. coli*, destacando a cobertura e identidade com a sequência predita de aminoácidos da Apn1 de *C. neoformans*. **B)** Resultados de alinhamento de sequências de Apn2 de *S. pombe*, *H. sapiens*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* e *E. coli*, destacando a cobertura e a identidade com a sequência predita de aminoácidos da Apn2 de *C. neoformans*. Os números de acesso no banco NCBI são descritos em cada representação da proteína. Os triângulos representam os aminoácidos-chave para os sítios catalíticos; Ident: porcentagem de identidade de aminoácidos fornecida pela análise Blastp no NCBI. EEP: exonuclease-endonuclease-fosfatase. zf-GRF: domínio de dedo de zinco. 66

Figura 7 Interações físicas e genéticas realizadas pela proteína Apn2 de *S. cerevisiae*. Em roxo interação física entre as proteínas; em verde, interações genéticas. Figura gerada pelo site yeastgenome, disponível em (<https://www.yeastgenome.org/locus/S000000115/interaction>). 70

Figura 8. A proteína predita Apn2 de *C. neoformans* possui um cluster de cisteínas semelhante ao observado na proteína APE1 humana. **A)** proteína APE1 humana. Em vermelho a região do cluster de cisteínas envolvido na atividade de ativação redox transcricional (retirada de (Luo et al. 2012); **B)** Proteína Apn2 de *C. neoformans* modelada neste trabalho usando o software online swiss-model (sequência de aminoácidos da proteína APE1 usada como molde (33,99% identidade). Regiões destacadas em amarelo representam a localização das cisteínas que são chaves para a possível função redox dessa proteína fúngica (função ainda sem evidência experimental). 71

Figura 9. Confirmação de mutantes por PCR. Confirmação por PCR da deleção de genes alvo em cepas mutantes. Representação esquemática de quatro conjuntos de PCR para confirmação da interrupção dos genes *APN1* e *APN2*. A PCR 1 foi realizada com iniciadores projetados fora da região flanqueadora na porção 5' do gene, e região de flanqueamento 3' (setas pretas). Os mutantes confirmados geraram um único fragmento em PCR1 que diferia em tamanho daquele do WT e das cepas reconstituídas específicas. A PCR 2 consistiu em reações usando iniciadores específicos para o gene alvo (setas brancas). Esperava-se que o gene alvo fosse amplificado a partir do gDNA WT, ao passo que nenhum amplicon fosse gerado a partir do DNA dos mutantes confirmados. PCR3 foi realizada com iniciadores projetados para as regiões 5' e 3' externas (setas pretas) e para o marcador de resistência a antibióticos (HYG: Higromicina B; NAT: Nourseotricina; setas cinza). Esperava-se que os amplicons na PCR 3 fossem gerados

apenas a partir do DNA dos mutantes confirmado. A PCR 4 foi realizada usando uma combinação de iniciadores para a região flanqueadora e específicos para o gene alvo (setas brancas). No PCR 4, esperava-se que os genes-alvo fossem amplificados apenas a partir do DNA das cepas reconstituídas. **A)** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com 0,5 µg / mL de EtBr do DNA referente ao gene *APN1* e amplicons das cepas reconstituídas. **B)** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com 0,5 µg / mL de EtBr do DNA referente ao gene *APN2* e amplicons das cepas reconstituídas. O tamanho dos amplicons é indicado em pares de bases (bp). 75

Figura 10. Confirmação de deleção do *locus* do gene *APN1* por Southern Blot. O gDNA dos fungos selvagem e mutantes foram incubados com as enzimas *StuI* e *SalI* separadamente e o padrão do tamanho dos fragmentos gerados foi analisado por Southern Blot. A marcação dos fragmentos foi realizada com a hibridização de sonda marcada com Dioxigenina. Pontas de setas – Sítios de clivagem das enzimas. 75

Figura 11. Efeito da deleção dos genes *APN1* e *APN2* sobre o crescimento de *C. neoformans*. Leveduras de *C. neoformans* na concentração de 10⁵ cel/ mL foram inoculadas em meio YPD líquido e cultivadas a 30 °C e 37 °C. O crescimento celular foi determinado por meio de densidade óptica a 600 nm (OD 600 nm) a cada 24 h, por um total de 96 h. 77

Figura 12. Fenótipos relacionados à temperatura e ao estresse celular químico dos mutantes de genes *APN-like* de *C. neoformans*. Diluições em série de dez vezes para as cepas indicadas foram aplicadas em YPD sólido suplementado com diferentes compostos a 30 °C (**A**) e 37 °C (**B**). O crescimento foi avaliado após 48 h de incubação. EMS: etilmetanossulfonato; MMS: sulfonato de metileno; HU: hidroxureia; MND: Menadiona). 79

Figura 13. Os mutantes *apn1Δ*, *apn2Δ* e *apn1Δapn2Δ* não são suscetíveis a agentes oxidantes em meio sólido. Culturas de leveduras de *C. neoformans* WT, linhagens mutantes e reconstituídas foram diluídas em série de dez vezes e inoculadas em ágar YPD suplementado com 0,03 mM de menadiona (MND), 4 mg / mL de nitrito de sódio (NaNO₂) ou 1 ou 3 mM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O crescimento foi acessado após 48 h de incubação, a 30 °C, protegido da luz. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes. 80

Figura 14. Ensaio de viabilidade após o tratamento das células com diferentes intensidades de radiação UV. **A)** Culturas de leveduras de *C. neoformans* WT, linhagens mutantes e reconstituídas foram diluídas em série de dez vezes e inoculadas em ágar YPD

e expostas à diferentes energias de radiação UV. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa 30 °C e observadas após 48 h de crescimento. **B)** Um total de 5×10^2 células de *C. neoformans* foram plaqueadas em YPD sólido e expostas à radiação UV nas energias de 120, 240 e 480 J/m² a 254 nm. O grupo controle refere-se às diferentes culturas em meio YPD sólido sem exposição à radiação UV. As culturas foram incubadas a 30 °C por 48h, protegidas da luz para contagem de UFC. O gráfico representa a porcentagem de células viáveis dos tratamentos normalizada pela porcentagem de células viáveis do grupo controle (células da linhagem selvagem H99). *One-Way analysis of variance* (ANOVA) com pós-teste de Dunnett foi usado para comparar as médias dos resultados obtidos em três experimentos diferentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. **** p < 0,0001..... 82

Figura 15. Avaliação do fenótipo de cepas *C. neoformans* mutantes de BER após a exposição a agentes alquilantes de DNA. As diferentes cepas foram diluídas em série e plaqueadas em YPD ágar suplementado com agentes indutores de danos no DNA: 0,03% metano-sulfonato de metila (MMS), 0,04% de metano-sulfonato de etila (EMS), 200 µg / mL N -etil-N-nitrosourea (ENU), brometo de etídio 20 µg / mL (EtBr) ou hidroxureia 110 mM (HU). As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. 83

Figura 16. A deleção dos genes de reparo não induziu sensibilidade a drogas genotóxicas em meio sólido. Os genes de reparo selecionados para esse estudo não se mostraram indispensáveis ao crescimento em temperaturas de 37 °C ou em outras condições de estresse. As diferentes linhagens mutantes e o tipo selvagem foram diluídas em série (10x por ponto – ver métodos) e 5 µL de cada diluição foram semeados em meio ágar: YPD, metil metanosulfonato (MMS), etil metanosulfonato (EMS), sulfato de cádmio (CdSO₄), e hidroxureia (HX) em diferentes concentrações. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C. A esquerda, crescimento em meio nutritivamente rico (YPD) como controle do experimento; a direita, crescimento em placas de ágar contendo os estressores na concentração indicada acima da imagem. 84

Figura 17. *apn2Δ* e *apn1Δapn2Δ* são sensíveis à diferentes ao MMS e EMS. Os fungos foram diluídos e incubados em meio YPD líquido contendo diferentes drogas genotóxicas, em diferentes condições. **A)** Viabilidade celular após exposição a 0,1 ou 0,2% MMS ou **B)** 0,1 ou 0,2% EMS. As cepas foram expostas aos agentes em YPD líquido por 1 h, a 30 °C e 150 rpm. As células foram então lavadas com solução salina de tampão fosfato (PBS) e semeadas em ágar YPD para contagem de UFC. Os gráficos

representam a porcentagem de células viáveis dos tratamentos normalizadas pela porcentagem de células viáveis do grupo controle. A cepa WT H99 foi usada como controle para análise estatística. ANOVA unilateral com o teste de comparações múltiplas de *Dunnett* foi usado para comparar as médias dos resultados de três experimentos independentes. As barras de erro representam erros padrão da média. **** p <0,0001; *** p <0,001; * p <0,05..... 86

Figura 18. O tratamento com H₂O₂ e MX aumenta o efeito de H₂O₂ na viabilidade de *C. neoformans*. O gráfico mostra o perfil de sobrevivência celular das linhagens selvagem e mutantes de *C. neoformans* após exposição combinada a H₂O₂ e MX. As linhagens fúngicas foram cultivadas em YPD líquido contendo MX na concentração de 0,417 mg/mL e (A) 3 ou (B) 5 mM de H₂O₂, durante 1 h, à 30 °C com agitação a 150 rpm. As células foram incubadas apenas em YPD contendo 3 ou 5 mM de H₂O₂ para análise comparativa. Os gráficos representam a porcentagem de sobrevivência de cada linhagem exposta às condições específicas de tratamento descritas, comparado à condição controle (meio YPD). Estatística realizada utilizando Two-Way ANOVA com comparações múltiplas (Sidak's test) das médias de três experimentos independentes. Barras de erro representam erro padrão da média. **** p < 0,0001; *** p < 0,001. 92

Figura 19. A deleção dos genes *APN1* e *APN2* sensibiliza *C. neoformans* ao tratamento com Zeocina. Fungos das linhagens selvagem e mutantes foram diluídos para a densidade de 5 x 10⁶ cél/mL. Inóculos foram incubados em meio YPD contendo Zeocina nas concentrações 0,04%; 0,08%; 0,12% e 0,16%, por 1 h, a 30 °C. As células foram lavadas, diluídas e plaqueadas em meio sólido YPD para contagem de UFC. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h e as UFC contadas. 93

Figura 20. Deleção de *APN2* induz fragmentação de DNA em resposta à exposição de *C. neoformans* à Zeocina. Análise de integridade do DNA genômico por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/mL de EtBr. O DNA da linhagem selvagem H99 não exposta à droga foi usada como controle negativo de degradação do DNA (DNA genômico íntegro). As linhagens H99 e mutantes foram expostas à 0,08% de Zeocina em meio líquido por 1h. As células foram lavadas e o DNA extraído conforme descrito em Material e métodos. O resultado é representativo de três experimentos independentes. 94

Figura 21. Avaliação da atividade da Urease. Um total de 5 x 10⁶ cél/mL foi cultivado durante 48 h a 30 °C e 37 °C em meio *Christensen's* sólido e líquido contendo indicador de pH vermelho de fenol e solução de ureia. A coloração rosada indica atividade de

urease. Poços contendo apenas o meio foram usados como controle de alteração de cor. 95

Figura 22. A atividade de fosfolipase foi aumentada após deleção do gene *APN1*. As células foram cultivadas durante 72 h a 30 °C em meio ágar contendo gema de ovo. A presença de um halo translúcido ao redor das colônias indica atividade de fosfolipase. A atividade de fosfolipase (Pz) foi mensurada de acordo com Price et al. (1982). Teste estatístico: test t *p < 0.05. As barras de erro representam o desvio padrão da amostra. Experimento representativo de três com resultados similares entre eles..... 96

Figura 23. A produção de melanina por *C. neoformans* é afetada pela deleção de *APN1* e *APN2*. As leveduras foram cultivadas em MM durante 144 h a 37 °C, (150 rpm para meio líquido), na presença de 1 mM de L-DOPA, ao abrigo da luz. A imagem acima é representativa do acúmulo do pigmento após 72 h e 144 h de crescimento em meio indutor. A produção de melanina é atrasada nos mutantes *apn2Δ* e *apn1Δapn2Δ*, sendo apenas observada após 144 h de cultivo. Resultados semelhantes foram obtidos para incubação a 30 °C, em três experimentos independentes. 97

Figura 24. O tamanho da cápsula não foi alterado com a deleção de genes das vias BER de reparo de DNA. A cápsula foi detectada através do método de exclusão do nanquim. As imagens representativas das células observadas sob aumento de 35X para cada linhagem nas diferentes temperaturas de crescimento. As caixas representam 75 % da distribuição dos dados e as linhas pontilhadas horizontais representam as medianas. As barras indicam valores mínimos e máximos. Teste estatístico Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Resultados representativos de três experimentos independentes..... 98

Figura 25. Os genes *APN1* e *APN2* são necessários para a produção de melanina por *C. neoformans*. **A)** Viabilidade de células de *C. neoformans* após exposição a metoxiamina (MX). As células das cepas WT e mutantes foram incubadas em meio YPD líquido por 1 h, a 30 °C e 150 rpm na ausência (controle) ou na presença de MX (0, 0,417, 0,83 ou 1,67 mg / mL). As células foram então lavadas com PBS e o número de CFUs foi quantificado. O gráfico representa a porcentagem de sobrevivência de cada cepa exposta a MX em comparação com a condição de controle. O H99 selvagem foi usado como um grupo de controle para comparação estatística. *One-way* ANOVA com pós-teste de *Dunnnett* foi usado para comparar as médias dos resultados de três experimentos independentes. As barras de erro representam erros padrão da média. **** p <0,0001; *** p <0,001; * p <0,05. **B)** Produção de melanina após exposição de células de levedura a MX. As células de cada cepa foram incubadas com 0,417 mg / mL de MX por 1 h, a 37

° C, lavadas com PBS, diluídas e inoculadas para análises de produção de melanina. A detecção visual foi realizada diariamente e fotodocumentada após 72, 96 e 144 horas de crescimento. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. **C)** Viabilidade celular de cepas de *C. neoformans* após exposição a MX e indução da síntese de melanina. Alíquotas de suspensões de células foram coletadas das placas de ensaio de melanina após 144 h de incubação, e as células viáveis foram avaliadas por contagem de UFC. *One-way* ANOVA com pós-teste de *Dunnett* foi usado para comparar as médias dos resultados de três experimentos independentes. 99

Figura 26. A ausência dos genes *APN* em *C. neoformans* reduziu a sobrevivência fúngica em macrófagos *in vitro*. BMDMs foram co-cultivados por 2 h ou 24 h com diferentes linhagens de *C. neoformans* previamente opsonizados com 10 µg/mL de anticorpo 18B7. Triplicatas de cada linhagem foram adicionadas a placa de 96 poços contendo os macrófagos M2 em um MOI (multiplicity of infection) de 5:1. (n = 3 experimentos, *** p < 0.001). **A)** Porcentagem de fagocitose. Os resultados da porcentagem de fagocitose são apresentados como médias ± intervalo de confiança de 95% de células fagocíticas que internalizaram o fungo. **B)** Índice de fagocitose. Porcentagem de fagocitose foi calculada como a relação entre macrófagos que fagocitaram e todos os macrófagos contados. **C)** Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (CFU) recuperadas de BMDMs infectados com diferentes linhagens de *C. neoformans*, após 2 h, ou **(D)** 24 h de infecção. as BMDCs foram lavadas, lisadas com solução de SDS (0,05%), semeadas em meio YPD e incubadas a 30 °C por 48 h. Os resultados são apresentados como médias. Os pontos representam os dados representativos de réplicas técnicas. Teste estatístico: *One-way* ANOVA com pós-teste de *Dunnett*** p < 0,01. Dados de três experimentos biológicos independentes. 103

Figura 27. Avaliação da virulência de mutantes *apn* de *C. neoformans* usando modelo de infecção por *G. mellonella*. As larvas foram infectadas na última propata esquerda com 10 µL de suspensão de células (total de 10⁶) de cepas de *C. neoformans* (WT, *apn1Δ*, *apn2Δ*, *apn1Δapn2Δ* mutantes) ou 10 µL de PBS (controle). Após a infecção, as lagartas foram incubadas a 37 °C e monitoradas diariamente para avaliação da sobrevivência. **A)** Comparação entre curvas de sobrevivência de lagartas infectadas com H99 e *apn2Δ*. **B)** Comparação entre as curvas de sobrevivência de lagartas infectadas com H99 e mutante *apn1Δapn2Δ*. **C)** Curvas de sobrevivência das larvas infectadas com WT, *apn1Δ*, *apn2Δ*, *apn1Δapn2Δ* e o Controle PBS. As curvas de sobrevivência foram analisadas usando o teste Log-rank (Mantel-Cox). 104

Figura 28. Representação da atividade de reparo de lesões por excisão de nucleotídeos (NER) em mamíferos. **A)** Lesões volumosas de DNA que desestabilizam a dupla fita. Essas lesões podem advir de diferentes agentes e condições. **B)** Na via GG-NER (via de reparo genômico), lesões com forte distorção são reconhecidas diretamente pelo complexo XPC-RAD23B, que se liga à fita não danificada oposta à lesão. **C)** TFIIF interage com XPC-RAD23B e abre o DNA com sua subunidade XPB, permitindo que XPD rastreie o DNA até parar no dano. Em seguida, o complexo verifica a modificação química (volume) da lesão. **D)** O bloqueio de XPD na lesão permite a formação do complexo de pré-incisão por recrutamento de XPA, RPA e XPG. **E)** Recrutamento de ERCC1-XPF para o complexo (por interação com XPA) leva à incisão na porção 5' da lesão. **F)** Início da síntese de reparo por Pol δ e Pol κ ou Pol ϵ e fatores associados, seguido por incisão na porção 3' por XPG. **G)** A conclusão da síntese de reparo e selagem do corte por DNA ligase III α / XRCC1 ou DNA ligase I completa o processo. Adaptado de Schärer, 2013. 137

Figura 29. Representação do alinhamento de sequências XPC/Rad4. Os alinhamentos foram gerados no programa Blastx usando a sequência CNAG_01338 como entrada, contra os genomas de *C. albicans*, *S. pombe*, *H. sapiens* e *S. cerevisiae*. Os resultados foram representados conforme o score de alinhamento. A superfamília Rad4 foi o domínio de atividade presente na sequência XPC de *C. neoformans*. Os domínios Rad4 estão representados conforme posicionamento na sequência de XPC de *C. neoformans*. 139

Figura 30. O mutante *xpc* Δ apresenta fenótipo alterado em resposta ao estresse osmótico e genotóxico. **A)** As células foram serialmente diluídas e pipetadas em meio YPD sólido contendo KCl 1,5 M; NaCl 1,5 M; MMS 0,03%; HU 100 mM e cultivadas durante 48h a 30° C. **B)** Quantificação da porcentagem de sobrevivência das linhagens após tratamento com Zeocina 0,08%; MMS 0,03% e EMS 0,034%. A contagem de UFC foi realizada e a porcentagem de sobrevivência calculada em relação a contagem de UFC em meio sem estressor e com estressor, dentro de cada linhagem. A linhagem H99 foi usada como controle. **C)** Sessão de placa de UFC obtida após incubação da linhagem *xpc* Δ com a droga Zeocina 0,08%. Setas amarelas indicam tipos diferentes de morfologia de colônia observados. Teste estatístico T-student. *denota $p < 0.01$. Experimento representativo de triplicata. 140

Figura 31. O mutante *xpc* Δ apresenta fenótipo alterado em resposta ao estresse oxidativo. **A)** As células das linhagens mutantes *xpc* Δ e selvagem foram serialmente diluídas e

pipetadas em placas YPD contendo H₂O₂ 5 mM ou MND 300 uM. As placas foram incubadas em estufa 37 °C, por 48 h. Resultado representativo de três replicatas. **B)** Células foram incubadas em meio YPD líquido contendo H₂O₂ 3 mM ou MND 100 uM, a 37 °C, sob agitação por 1, e a sobrevivência medida por contagem de UFC. Teste estatístico *T-student*. *denota p< 0.05; barras de erro representam o desvio padrão da amostra. Experimento representativo de triplicata 141

Figura 32. Deleção de *XPC* reduz a produção de fosfolipase mas não interfere na produção de melanina ou urease. **A)** As células foram cultivadas em meio *Christensen's* para análise da produção e atividade de urease (documentação após 48h de crescimento em meio indutor); e em meio mínimo (MM) suplementado com L-DOPA para avaliação da produção e acúmulo de melanina (documentação após 48 h e 72 h de crescimento em meio indutor). **B)** As células foram cultivadas durante 48h a 30 ° C em meio ágar contendo gema de ovo. H99 foi usado como controle. A presença do halo translúcido ao redor da colônia indica atividade de fosfolipase (Pz). A Pz foi mensurada de acordo com (MF, ID, and LO 1982). Teste estatístico T-student. * p< 0.01; barras de erro representam o desvio padrão da amostra. Experimento representativo de triplicata..... 143

Figura 33. Deleção do gene *XPC* não interfere no processo de fagocitose por macrófagos. O experimento de fagocitose foi realizado conforme descrito na seção material e métodos. Não houve diferença significativa na porcentagem de fagocitose (**A**) ou índice de fagocitose (**B**) das linhagens selvagem e mutante *xpcΔ* por macrófagos M2, nas condições testadas. 144

Lista de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 Lista de componentes das vias BER, NER e MMR. | 36 |
| Tabela 2. Descrição da análise de fatores envolvidos na regulação transcricional de Apn2(YBL019W) de <i>S. cerevisiae</i> , gerada pela análise no domínio http://www.yeasttract.com/ | 68 |
| Tabela 3. Descrição dos mecanismos de ação dos agentes estressores usados neste trabalho. | 76 |
| Tabela 4. Valores de MIC de anfotericina B (AmpB), cloridrato de metoxiamina (MX) e fluconazol (Flu),5-flucitosina (5-FLu) e terbinafina (Terb) contra H99, <i>apn1</i> Δ , <i>apn2</i> Δ e <i>apn1</i> Δ <i>apn2</i> Δ e as respectivas cepas reconstituídas. | 88 |
| Tabela 5. Valores CMI de anfotericina B (AmpB) e cloridrato de metoxiamina (MX) em combinações e valores de índice de concentração inibitória fracionária (FICI). | 91 |

1. Introdução

Fungi é um reino diverso de microorganismos eucarióticos (Walker and McGinnis 2014). Cerca de 100 mil espécies de fungos foram descritas até o presente momento, das quais uma grande porcentagem obtém nutrientes por associação com outros organismos, especialmente plantas (Walker and McGinnis 2014; Cooney and Klein 2008). Muitos fungos são patogênicos e podem causar grande impacto na saúde humana, bem como desencadear danos severos à economia devido à infecções em plantações e animais (Walker and McGinnis 2014). Em conformidade à enorme diversidade de organismos, os fungos podem ocupar diferentes nichos na natureza. Certos fungos, tais como *Candida albicans* são comensais, enquanto outros, como *Cryptococcus neoformans* comumente de vida livre, podem se tornar patógenos oportunistas. Dentre os fungos que infectam humanos, os quatro maiores patógenos fúngicos são *C. albicans*, *C. neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Histoplasma capsulatum* (J.-Y. Kim 2016)

Patógenos oportunistas são tipicamente caracterizados pela literatura médica como organismos que se tornam patogênicos em decorrência de perturbações no hospedeiro (por exemplo, queda da imunidade decorrente de doenças, medicamentos, infecções prévias, imunodeficiência ou envelhecimento (S. P. Brown, Cornforth, and Mideo 2012)). Oportunistas podem emergir dentre organismos comensais simbiotes, como *Staphylococcus aureus*, ou dentre microorganismos do ambiente, como *Pseudomonas aeruginosa* (Head and Yu 2004). Há ainda organismos considerados oportunistas por oscilarem entre diferentes espécies de hospedeiros como (*Bacillus anthracis*) (Lenhart et al. 2012), e *C. neoformans*.

Mais de 300 milhões de pessoas sofrem com infecções fúngicas sérias, resultando em mais de 1.350 milhão de mortes (S. P. Brown, Cornforth, and Mideo 2012). Infecções fúngicas podem desencadear doenças agudas, como a criptococose e aspergilose invasiva, doenças crônicas como aspergilose broncopulmonar alérgica, cromoblastomicose, ou ainda doenças de menor impacto, como infecções superficiais dérmicas causadas por espécies de *Candida* (Tan and Hsu 2018). Doenças fúngicas podem ocorrer em consequência de supressão da resposta imune, ocorrida em diferentes situações, como tratamentos quimioterápicos de cânceres, terapias imunossupressivas para transplante de órgãos, ou tratamentos com corticosteroides contra inflamações. Mais de 90% das mortes associadas à fungos reportadas no mundo resultam de espécies de três gêneros: *Cryptococcus*, *Candida* e *Aspergillus* (S. P. Brown, Cornforth, and Mideo 2012).

A ineficiência de tratamento das doenças, decorrente de diagnósticos inadequados ou mesmo tardios, podem resultar em efeitos colaterais crônicos, cegueira ou mesmo a morte.

1.1. *C. neoformans*

O fungo *C. neoformans* é um exemplo de patógeno oportunista de impacto global. É um basidiomiceto encapsulado de distribuição cosmopolita amplamente difundido no ambiente, sendo principalmente encontrado em excretas de aves, como pombos ou canários (Fries and Casadevall 1998). Dentre as espécies de *Cryptococcus*, a ampla maioria é considerada de vida livre, sendo poucas as espécies com importância na micologia médica. As duas principais espécies patogênicas que atingem humanos são *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A, D, AD) e *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Sorotipos B e C) (Levitz 1991; Billmyre, Clancey, and Heitman 2017; Kyung J. Kwon-Chung et al. 2014). Novas espécies de *Cryptococcus* continuam sendo descobertas, como *C. deuterogattii*, a partir da identificação de variabilidade genotípica.

A variação *C. neoformans* é encontrada em forma de levedura em excretas de aves, especialmente pombos. Comumente, a inalação de leveduras ou basidiósporos de *C. neoformans* não induz quadros de infecção sintomática (Figura 1). Contudo, quando em contato com indivíduos imunocomprometidos, pacientes transplantados ou portadores do vírus HIV, por exemplo, o fungo pode causar infecção grave e desencadear situações clínicas severas como meningoencefalite, podendo culminar no óbito do paciente (Bicanic and Harrison 2004; Loftus et al. 2005; Xue 2012). A espécie *C. gattii* é encontrada em regiões geográficas mais restritas. Ao contrário de *C. neoformans*, *C. gattii* é encontrado quase exclusivamente em associação com certas espécies de plantas, incluindo árvores de eucalipto (Byrnes et al. 2011). As infecções por *C. gattii* têm algumas características semelhantes às causadas por *C. neoformans*, no entanto, *C. gattii* tende a causar doenças com mais frequência em pessoas sem comprometimento do sistema imune. Além disso, as infecções por *C. gattii* frequentemente se apresentam com abscessos cerebrais focais, em vez de infecções mais generalizadas do sistema nervoso central (Byrnes et al. 2011).

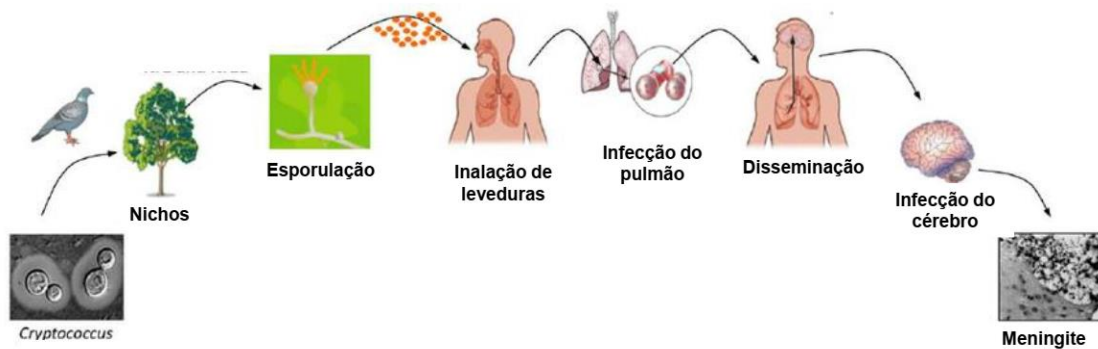


Figura 1 Infecção por *Cryptococcus*. As células de *Cryptococcus* existem no ambiente associando-se a vários nichos, incluindo pássaros, solo e plantas. Os esporos inalados por humanos podem entrar nos pulmões e causar infecção pulmonar. As células fúngicas também podem ser disseminadas para o sistema nervoso central (SNC) e causar meningite fúngica. Adaptado Xue et al., 2012.

No ciclo de vida de *C. neoformans* há reprodução sexual e assexual. Na reprodução sexual, a conjugação entre os dois *mating types* (formas de acasalamento) ($MAT\alpha$ e $MATa$) resulta na formação de micélios dicarióticos, basídios e após meiose, basidiósporos, que germinam em leveduras (K J Kwon-Chung, Edman, and Wickes 1992). Até recentemente, a predominância avassaladora do tipo de acasalamento α de ambas as variedades de *C. neoformans* na natureza e entre os isolados clínicos foi inexplicada, uma vez que a reprodução sexual deve resultar em segregação de $MAT\alpha$ e $MATa$, gerando números iguais de progênie dos dois tipos sexuais (como demonstrado em cruzamentos de laboratório) (K J Kwon-Chung, Edman, and Wickes 1992). Foi notado que a maioria das cepas ambientais são haplóides e heterotáticas, embora poucos possam ser auto-férteis, produzindo basidiósporos sem aparente acasalamento. $MAT\alpha$ é o tipo sexual mais virulento em camundongos e mais comumente encontrados em casos clínicos de infecção por *C. neoformans* (K J Kwon-Chung, Edman, and Wickes 1992).

Além de sua importância clínica, *C. neoformans* é um excelente modelo para estudar a patogênese dos fungos (Mylonakis et al. 2005; Srikanta, Santiago-Tirado, and Doering 2014). As sequências do genoma de cepas de *C. neoformans* (JEC21, B-3501 e H99) foram totalmente sequenciadas. A cepa do sorotipo A (H99), que é a forma patogênica mais comum (representando mais de 95% dos casos de criptococose em pacientes com AIDS) (Loftus et al. 2005). O sequenciamento dos genomas das diferentes cepas de *C. neoformans* viabiliza estudos mais completos de ganho de características e impacto das relações com o ambiente nas alterações genômicas evolutivas, além de possibilitar a aplicação de uma série de técnicas de manipulação genética, incluindo a deleção de genes alvo e RNAi (M. S. Kim et al. 2009). Os mecanismos base de virulência

de *C. neoformans* já estão bastante elucidados, com muitos de seus fatores e atributos de virulência já descritos e bem caracterizados na literatura (O. W. Liu et al. 2008; Casadevall 2007). Somado a isso, ensaios robustos com modelos animais de infecção já estão disponíveis para avaliar o papel dos genes na virulência de *C. neoformans* (J.-Y. Kim 2016; García-Rodas et al. 2011a; Mylonakis et al. 2005). Todas essas características embasam a utilização de *C. neoformans* como modelo para estudos de patogenicidade fungica.

A Criptococose é uma doença fúngica de impacto mundial, com elevada incidência e morbidade. A maior prevalência é observada na África Sub-saariana, onde estima-se que 624 mil mortes sejam atribuídas ao *Cryptococcus*, número mais expressivo do que ao atribuído à tuberculose (Rajasingham et al. 2017; Kyung J. Kwon-Chung et al. 2014; Bicanic and Harrison 2004). Pacientes tratados, comumente apresentam reincidência devido ao desenvolvimento de resistência a drogas antifúngicas, o que resulta em níveis de mortalidade acima dos 30%. (Sabiiti and May 2012; Srikanta, Santiago-Tirado, and Doering 2014). O entendimento da dinâmica de interação entre patógeno e hospedeiro é conhecimento chave para elucidar os mecanismos de implementação, desenvolvimento e agravamento de infecções. Dentre os mecanismos dos microorganismos para ter sucesso na infecção de diferentes hospedeiros, a produção de atributos de virulência, componentes capazes de promover proteção física e/ou química contra as diferentes vias de defesa do hospedeiro, é uma estratégia associada diretamente à patogenicidade de *C. neoformans*.

1.2. Atributos de virulência de *C. neoformans*

A hipótese pioneira sobre evolução da virulência assume que fatores de virulência expressos pelos patógenos são mantidos para auxiliar a adaptação, e aumentar o crescimento e a dispersão em/entre hospedeiros (S. P. Brown, Cornforth, and Mideo 2012). Contudo, diversos estudos têm demonstrado que patógenos oportunistas, clinicamente definidos como organismos que se tornam patogênicos em decorrência de perturbações no hospedeiro, não se encaixam nessa teoria, já que seus atributos de virulência permanecem, ainda que em contexto não-patogênico (Casadevall and Pirofski 2001; S. P. Brown, Cornforth, and Mideo 2012). Muitos patógenos apresentam alta plasticidade fenotípica, sendo capazes de modificar o fenotipo em concomitância com as mudanças ambientais.

A interação entre fungos patogênicos e as células hospedeiras tem papel fundamental no desenvolvimento de quadros infecciosos (Karkowska-Kuleta, Rapala-Kozik, and

Kozik 2009; Y. Chen et al. 2017). *C. albicans* e *C. neoformans* são fungos oportunistas que aumentaram sua capacidade de causar doenças sérias através de interações com predadores ambientais, como amebas, ao longo dos milênios de suas existências (Casadevall et al., 2003). A capacidade de sobreviver dentro do organismo hospedeiro está diretamente associada à produção de componentes fúngicos capazes de combater as respostas imunológicas do hospedeiro, componentes estes chamados de atributos de virulência (Zaragoza et al. 2009; A. J. P. Brown et al. 2013; Nosanchuk, Stark, and Casadevall 2015; Kozubowski and Heitman 2012; Casadevall and Pirofski 2001). Alguns desses atributos serão apresentados a seguir.

A termotolerância é um atributo de virulência que permite aos microorganismos crescerem dentro de hospedeiros diversos, inclusive em mamíferos, onde a temperatura média atinge 36,5 °C. (S. P. Brown, Cornforth, and Mideo 2012). Ela envolve a expressão de diferentes genes, dentre os quais os codificadores da proteína calcineurina, uma fosfatase dependente de Ca^{2+} /calmodulina, e da proteína Ras1. Organismos mutantes incapazes de sintetizar tais proteínas mostraram sérios problemas de crescimento *in vitro* a 37 °C (D.-H. Yang et al. 2017; Bloom et al. 2019). A termotolerância permite que o fungo *C. neoformans* possa crescer e proliferar em temperaturas entre 35–39 °C. Linhagens mutantes com defeitos de crescimento à 37 °C tendem a ser hipovirulentas, sendo este um dos primeiros fenótipos avaliados no estudo de deleção de genes em *Cryptococcus* (Esher, Zaragoza, and Alspaugh 2018; Bloom et al. 2019).

A cápsula polissacarídica é um atributo de virulência de *C. neoformans* muito estudado. Essa é constituída por polissacarídeos antigênicos, tais como glicuronoxilomana (GXM), galactoxilomana (Galxm) e manoproteína (MP) (Zaragoza et al. 2009). A produção da cápsula exige uma complexa organização das vias metabólicas afim de fornecer os precursores de energia celular e carboidratos necessários para montar rapidamente essa estrutura complexa (Zaragoza et al. 2009). Oscar Zaragoza e colaboradores (2009) descreveram a cinética de produção da cápsula, e identificaram que o custo energético do processo de biossíntese da cápsula é altamente dependente de uma mitocôndria intacta, e que o crescimento da cápsula ocorre primariamente durante a fase G1 do ciclo celular (Zaragoza et al. 2009). A cápsula polissacarídica envolve a célula de *C. neoformans*, evitando a fagocitose, bloqueando a apresentação de antígenos às células T, suprimindo a produção de citocinas inflamatórias e reduzindo síntese das proteínas do complemento (Zaragoza et al. 2009). A indução da síntese da cápsula ocorre em resposta

a diversas condições associadas ao hospedeiro, como pH neutro/alcalino, níveis altos de CO₂, e privação de ferro, o que demonstra a importância da cápsula para a virulência de *C. neoformans* (Zaragoza and Casadevall 2004; Zhou et al. 2020; Zaragoza et al. 2009).

A melanina é um polímero pigmentado de coloração preta ou marrom, hidrofóbico e com carga residual negativa, produzido via oxidação de catecolaminas que se acumulam na parede celular de *C. neoformans* (Nosanchuk, Stark, and Casadevall 2015). A melanina protege as células fúngicas contra o estresse oxidativo, fagocitose, ação de antifúngicos e também modifica a resposta imune do hospedeiro (Nosanchuk, Stark, and Casadevall 2015; Y. Wang and Casadevall 1994). A formação da melanina requer a ação de uma enzima fenol oxidase, identificada como lacase, que pode sintetizar melanina a partir de precursores como L- e D- Dopa, dopamina, epinefrina e norepinefrina (ZHU and WILLIAMSON 2004). *C. neoformans* apresenta dois genes descritos para lacase, *LAC1* e *LAC2*, ambos são induzidos por privação de glicose (ZHU and WILLIAMSON 2004; Piscitelli et al. 2011). *LAC1* é o principal responsável pela síntese de melanina, apresentando níveis de transcrito basal maiores. O gene *LAC2* é adjacente ao *LAC1* no genoma e apresenta 75% de identidade de nucleotídeos com *LAC1*. Mutantes para o gene *LAC2* apresentaram apenas um modesto atraso na produção de melanina (PR 1997). A produção da cápsula e da melanina por *C. neoformans* contribuem para que o fungo escape da imunidade dos hospedeiros. A deleção de genes associados à produção de melanina e cápsula reduzem significativamente a virulência de *C. neoformans*, reduzindo a letalidade em ensaios com camundongos, contribuindo significativamente para a patogênese deste fungo (BL and JD 2003; Sabiiti et al. 2014).

As fosfolipases formam um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam ligações éster em glicerofosfolipídios e deste modo, desestabilizam membranas, promovendo a lise celular e a liberação de lipídios como segundos mensageiros (Ghannoum, 2000; Schmiel and Miller, 1999). Ao menos duas enzimas com atividade fosfolipásica foram descritas como fatores de virulência em *C. neoformans*. A fosfolipase B (Plb) é importante para a sobrevivência e replicação das leveduras no interior de fagócitos e para a disseminação fúngica (Djordjevic 2010). A fosfatidil-inositol fosfolipase C (Plc) auxilia na manutenção da morfologia celular e integridade da parede celular. A deleção do gene *PLB1* em *C. neoformans* reduz drasticamente a sobrevivência das leveduras após ensaios com macrófagos, além de causar alterações morfológicas que resultaram em tamanho celular aumentado (Djordjevic 2010).

Outro importante atributo de virulência é a enzima hidrolítica urease secretada por *Cryptococcus*, que catalisa a hidrólise da uréia em amônia e carbamato resultando em aumento do pH (Feder et al. 2015). Mutantes para o gene *URE1* em *C. neoformans* causam, em modelo murino, menor taxa de mortalidade quando comparados aos animais infectados com o tipo selvagem (Djordjevic 2010). A produção de urease facilita a evasão fúngica de células hospedeiras e facilita a difusão para o sistema nervoso central (Djordjevic 2010).

Hospedeiros mamíferos têm sua imunidade celular mediada por células fagocíticas, as quais combatem infecções fúngicas. Macrófagos, neutrófilos e outras células fagocíticas geram altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) que são tóxicas para a maioria dos patógenos por causar danos em biomoléculas, como DNA, proteínas e lipídios (Hori et al. 2009; Cooke et al. 2003; Salmon et al. 2004). A produção de ERO e ERN pelos hospedeiros implica na neutralização de patógenos fúngicos como *A. fumigatus*, *C. albicans*, e *C. neoformans* (Casadevall 2007). Essa afirmativa é baseada na correlação positiva existente entre a resistência de cepas selvagens e susceptibilidade de cepas mutantes para genes envolvidos no estresse oxidativo *in vitro*, e os respectivos fenótipos de virulência e avirulência destas cepas em modelos murinos de infecção (Chauhan, Latge, and Calderone 2006; Forche et al. 2011; Belfield et al. 2014; Missall, Pusateri, and Lodge 2004)

Sabe-se que *C. neoformans* não apenas resiste à morte pelo macrófagos após a fagocitose, como também continua a se replicar por brotamento em meio ao ambiente celular adverso, além de escapar do macrófago sem causar a lise de células do hospedeiro (Nicola et al. 2011). A capacidade de sobreviver e replicar em ambiente hostil sugere que o fungo possua mecanismos apurados não apenas para neutralizar as espécies reativas a que é exposto, mas também de reparar os danos celulares causados pelo estresse oxidativo e nitrosativo.

A grande diversidade de ambientes nos quais *C. neoformans* pode ser encontrado denota a capacidade de adaptação que este fungo possui. Alguns microorganismos patogênicos também possuem características adaptativas relacionadas a troca de nichos ambientais por ambientes intra-hospedeiro. No estudo do processo de adaptação desses organismos, descobriu-se que um dos mecanismos envolvidos no ganho de atributos que favorecem a transição de ambientes é a alteração do genoma (Adam, Dabin, and Polo

2015; Hoff et al. 2018; Morrow and Fraser 2013; Y. Chen et al. 2017; Glassner et al. 1998). Naturalmente, processos que envolvem modificação genéticas e mutações são aleatórios e seletivos, funcionando como gargalos microevolutivos no contexto patógeno-hospedeiro (Cagney et al. 2006; Sullivan et al. 1996; Geacintov and Broyde 2017; Billmyre, Clancey, and Heitman 2017)

1.3. Mecanismos de reparo de DNA

Molécula mais preciosa dentro das células, o DNA é alvo de diferentes tipos de lesões geradas por uma infinidade de estresses induzidos pela interação patógeno-hospedeiro. A correção de danos ao DNA é indispensável para a sobrevivência e patogenicidade dos fungos. Além do impacto indiscutível das vias de reparo do DNA na manutenção da integridade do DNA e perpetuação das espécies, os mecanismos do metabolismo do DNA também envolvem outros processos celulares importantes, como controle de importantes cascatas de sinalização, modulação da transcrição de genes oxidativos e responsivos ao estresse, modulação integridade do DNA mitocondrial (mtDNA) e funções mitocondriais, e influência direta na produção de atributos de virulência em patógenos. Dentre eles, os mecanismos de reparo do DNA também modulam a formação de fenótipos mutantes, intrinsecamente relacionados à variabilidade fúngica, adaptação à sobrevivência e patogênese dentro do hospedeiro.

As células precisam de mecanismos para garantir a estabilidade do genoma, e a recuperação da estrutura da molécula de DNA após lesões induzidas por situações de estresse. São consideradas lesões as alterações na estrutura da molécula de DNA, as quais podem ser desencadeadas por diferentes situações. Inserções, deleções, modificações e oxidação são algumas das alterações que atingem as bases nitrogenadas do DNA, podendo desencadear erros nas janelas de leitura das sequências, truncamento de genes e produtos gênicos, além de bloqueios transcricionais e replicativos. É possível dividir as lesões do DNA em grupos de acordo com sua origem, em espontâneas ou induzidas, e estas em endógenas e exógenas (Lombard et al. 2005; L. T and DE 2000).

As lesões mais comuns são perdas de bases da dupla fita de DNA. Apesar da ligação N-glicosídica entre a base do DNA e a desoxirribose ser relativamente estável, é possível que haja a reação de hidrólise espontânea com moléculas de água, liberando a base nitrogenada e formando um sítio abásico no DNA (Lindahl and Ljungquist 1975; L. T and DE 2000). São formados cerca de 10^6 sítios abásicos (ou AP), por célula, por dia, e

estes podem bloquear processos celulares como replicação e transcrição (Fung and Demple 2005). Outros exemplos de lesões espontâneas são a desaminação de bases nitrogenadas, onde a amina é removida das bases gerando problemas na codificação, e erros durante o processo replicativo.

As lesões no DNA também podem ser induzidas por fatores endógenos ou exógenos. Produtos ou bioprodutos do metabolismo e outros processos celulares podem ser altamente reativos. As espécies reativas de oxigênio (ERO), como o oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íons hidroxila (OH^-), bem como as espécies reativas de nitrogênio (ERN), óxido nítrico (NO) e dióxido de nitrogênio (NO_2), são os bioprodutos mais frequentes nas células (Salmon et al. 2004; Madeo et al. 1999). Os íons hidroxila são os mais reativos, uma vez que reagem com praticamente todas as biomoléculas, enquanto as demais espécies reativas são mais específicas. Quando as espécies reativas reagem com o DNA a principal consequência é a formação de bases oxidadas, como a conversão da guanina em 8-oxo-desoxiguanosina (8-oxo-dG). A formação da 8-oxo-dG favorece o surgimento de mutações de transverso GC – TA, uma vez que a adenina possui maior afinidade de pareamento com a 8-oxo-dG do que com a citosina (Agnez-Lima et al. 2012; Boiteux, Gellon, and Guibourt 2002). Sítios

Fatores externos, como por exemplo a radiação ultravioleta (RUV), causam lesões características no DNA. A RUV do sol é o tipo mais comum de radiação sofrida por organismos de vida livre. A radiação do tipo UV-A gera fotoprodutos secundários como radicais livres, enquanto raios UV-B causa a formação de dímeros ciclobutano de pirimidinas (CPDs) e 6-4 fotoprodutos (6-4 PPs) (Fortini and Dogliotti 2007; Rastogi et al. 2010). Tais lesões geram distorção da dupla fita de DNA e culminam no comprometimento da atividade de complexos replicativos e transcricionais. Outro exemplo de lesões por fatores exógenos são as quebras de fita simples (SSBs) ou de fita dupla (DSBs) do DNA em decorrência de radiação ionizante (IR), como raios gama ou raios X (JF 1994; Fortini and Dogliotti 2007; Hoff et al. 2018). Além das radiações, uma série de químicos possuem alta capacidade de gerar danos ao DNA, os quais serão discutidos posteriormente.

Apesar da contagem de lesões ser amenizada pela compartimentalização e enovelamento da molécula de DNA, a organização física da molécula não seria capaz de, por si, proteger a integridade das sequências de DNA. Diante disso, mecanismos de

correção dos danos gerados, como vias de reparo de DNA, são necessários, para a manutenção da estabilidade do genoma e sobrevivência celular (McKinnon 2013; Shiloh and Lehmann 2004; Lukas, Lukas, and Bartek 2011; Lombard et al. 2005). A manutenção da fidelidade das moléculas de DNA ao longo das gerações é mantida pela atuação de sistemas multiproteicos complexos, responsáveis pela leitura diagnóstica das bases e topologia da dupla fita de DNA, identificação de lesões de bases nitrogenadas e reparação das moléculas lesionadas antes da replicação do DNA (Shiloh and Lehmann 2004; Lukas, Lukas, and Bartek 2004).

Os sistemas de reparo de DNA podem variar em complexidade e são diferentemente ativados de acordo com as pressões do ambiente (Mark R. Kelley, Kow, and Wilson 2003). Os sistemas de reparo de DNA são divididos em sistemas de excisão de bases e nucleotídeos, reparo de fita simples e de fita dupla, reparo não-homólogo e de bases não pareadas (*mismatch*) (M.R. Kelley and Fishel 2016b). Cada sistema é especializado na correção de lesões específicas, crescendo em grau de complexidade de acordo com a severidade da lesão (M.R. Kelley and Fishel 2016b; Wallace 2014; RD 1996). Um resumo esquemático das principais lesões e as vias de reparo de DNA envolvidas no reconhecimento de cada uma delas é apresentado na **Figura 2**.

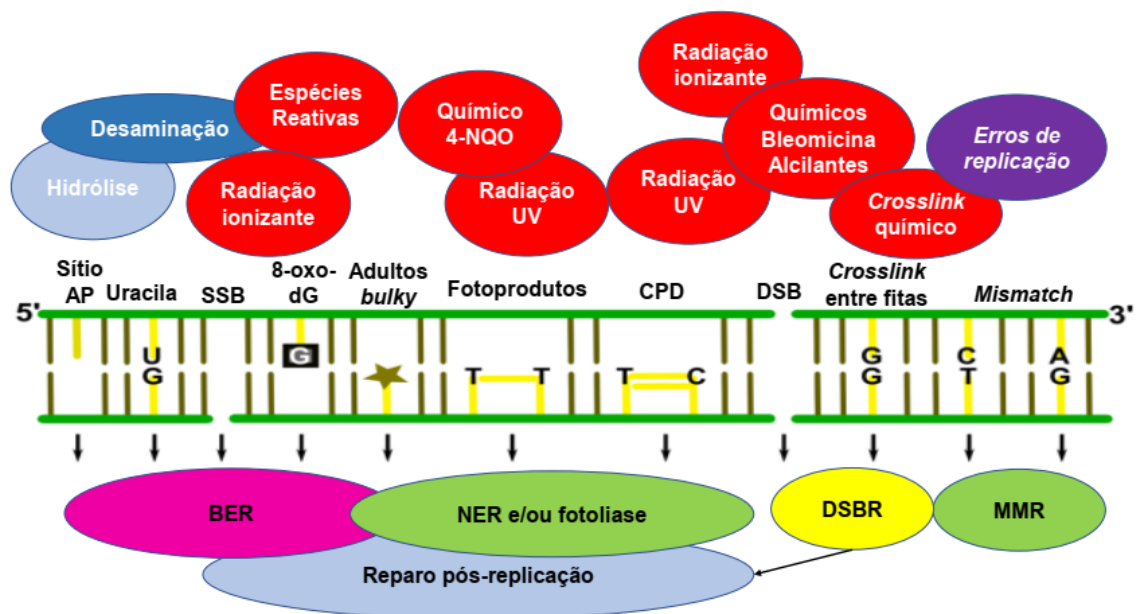


Figura 2. Especificidade das vias de reparo de DNA. Representação esquemática da interação entre agentes causadores de danos no DNA, tipos de lesões geradas e as vias de reparo responsáveis por cada processo. Conexões em amarelo representam anormalidades no pareamento. BER- Reparo por excisão de bases;

NER- Reparo por Excisão de nucleotídeos; DSBR- reparo de quebra de dupla fita; MMR- reparo de *mismatch*. Adaptado (Alexander, Kim, and Walker 2010).

As vias de reparo do DNA, em geral, seguem cinco etapas: reconhecimento, recrutamento, remoção, reconstrução e reintegração. Cada uma dessas etapas é mediada por uma infinidade de enzimas, altamente conservadas em eucariotos (Mark R. Kelley, Kow, and Wilson 2003). A etapa de reconhecimento detecta e localiza o dano. Na etapa de recrutamento, as proteínas estabilizam o local do dano, recrutam outras proteínas envolvidas no reparo e fornecem uma estrutura na qual essas proteínas podem se fixar e trabalhar. A etapa de remoção livra a fita de DNA das bases danificadas e processa o local da lesão para receber a (s) base (s) não danificada (s). A etapa de reconstrução insere novos nucleotídeos para preencher a lacuna e a etapa de reintegração restaura a configuração correta da hélice de DNA por meio da remoção de retalhos, cortes de selagem e extremidades de ligação (M.R. Kelley and Fishel 2016a).

Os mecanismos de reparo do DNA e suas enzimas específicas parecem desempenhar diferentes papéis e graus de importância em fungos patogênicos e não-patogênicos. Numerosos estudos foram publicados sobre o impacto dos mecanismos de reparo de danos ao DNA na levedura não-patogênica *Saccharomyces cerevisiae*. O assunto pode ser revisado nos trabalhos de Boiteux e Robertson (2017) e de Chalissery e colaboradores (2017) (Boiteux e Jinks-Robertson 2013; Chalissery et al. 2017).

O entendimento dos mecanismos de reparo do DNA de *S. cerevisiae* produz uma base forte para comparações com outros mecanismos de reparo de DNA de leveduras, em geral. Contudo, a correlação entre os mecanismos de reparo do DNA de leveduras não-patogênicas e patogênicas deve sempre considerar as diferenças na biologia e no ambiente de cada organismo, uma vez que há divergência na intensidade e natureza dos estressores característicos de cada nicho. Para uma melhor análise comparativa, alguns dos componentes enzimáticos das principais vias de reparo de DNA e seus homólogos em diferentes espécies, foram buscados na literatura e organizados na **Tabela 1**.

Tabela 1 Lista de componentes das vias BER, NER e MMR.

| | <i>S. cerevisiae</i> | <i>C. neoformans</i> | <i>C. albicans</i> | <i>S. pombe</i> | <i>A. nidulans</i> | <i>H. sapiens</i> |
|-----|----------------------|----------------------|--------------------|-----------------|--------------------|-------------------|
| BER | Ntg2 | Ntg1 | Ntg1 | Ntg1 | AN10978 | NTG1 |
| | Ogg1 | Ogg1 | Ogg1 | - | AN6682 | OGG1 |
| | Apn1 | Apn2 | Apn1 | Apn2 | AN3947 | APE1 |
| | Apn2 | Apn1 | Apn2 | Apn1 | AN4736 | APE2 |
| | Ung1 | Ung1 | C3_06400C_A | Ung1 | AN7435 | UDG1 |
| NER | Rad2 | Rad2 | Rad2 | Rad13 | AN5216 | Xpg |
| | Rad14 | Rad14 | Rad14 | Rhp14 | AN3784 | Xpa |
| | Rad1 | Rad1 | Rad1 | RAD16 | AN8713 | Xpf |
| | Rad10 | Rad10 | Rad10 | SWI10 | AN4331 | Erc1 |
| | Rad4 | Rad4 | C3_07660W_A | Rph41 | AN3890 | Xpc |
| | Rad27 | Rad27 | CR_04560C_A | RAD2 | AN2764 | FEN1 |
| | Rad23 | Rad23 | Rad23 | Rph23 | AN2304 | hHR23B |
| | Rad26 | - | CR_07910C_A | Rhp26 | cshA | Csb |
| | Rad28 | - | C3_02770C_A | Ckn1 | AN5235 | Csa |
| MMR | Msh2 | Msh2 | Msh2 | MSH2 | AN10621 | MSH2 |
| | Msh3 | Msh3 | Msh3 | Msh3 | AN3749 | MSH3 |
| | Mlh1 | Mlh1 | Mlh1 | Mlh1 | AN0126 | MLH1 |
| | Pms1 | Pms1 | Pms1 | PMS1 | AN11853 | PMS2 |
| | Mlh2 | - | - | - | - | PMS1 |
| | Mlh3 | - | Mlh3 | - | AN4365 | MLH3 |
| | Exo1 | Exo1 | Exo1 | EXO1 | AN3035 | EXO1 |

- homólogos não identificados.

No contexto dos fungos, a interação com o ambiente e a adaptação às variações de condições de estresse requerem a eficiência de algumas vias de reparo, em especial as vias de reparo de lesões de radiação, e reparo de lesões oxidadas (Chauhan et al. 2005; Y. Chen et al. 2017; Cagney et al. 2006; Magditch, Liu, Xue, and Idnurm 2012). Quando as lesões no DNA são fixadas e replicadas para as células-filhas, recebem o nome de mutações (Rosenberg 1997). No contexto geral, existem evidências de que, em microrganismos, a variação fenotípica e microevolução são geradas, dentre outros mecanismos, a partir de mutações no DNA. São exemplos, o descrito para *Pseudomonas aeruginosa*, cujos isolados de pacientes com fibrose cística são hipermutados quando comparados aos isolados do ambiente (Oliver et al. 2000); e a hipervirulência conferida por mutação pontual em *Candida glabrata* (Brunke et al. 2014). É importante salientar que a geração de mutações é um processo regulado por um equilíbrio dinâmico entre a estabilidade e a instabilidade da molécula de DNA, mediado principalmente pelos sistemas de reparo de DNA. Nesse contexto, a falha da atividade de reparo pode promover o aumento nas mutações em diferentes genes e tais mudanças podem ser importantes para

a adaptação de fungos à diferentes situações e hospedeiros (Aravind, Walker, and Koonin 1999).

As espécies de *Cryptococcus* sofrem microevolução tanto *in vitro* durante a cultura de laboratório quanto *in vivo* durante o curso da doença (Sullivan et al. 1996; Fries and Casadevall 1998). Alguns isolados clínicos são hipermutados e carregam mutações na via MMR de reparo DNA, especialmente o gene *MSH2* (Boyce et al. 2017). Cepas hipermutadas carregando mutações em *MSH2* também foram encontrados em uma das três expansões clonais do surto de *Cryptococcus deuterogattii* na região noroeste do Pacífico dos Estados Unidos e Canadá (Billmyre, Clancey, and Heitman 2017; RB, SA, and J 2017). Boyce e colaboradores (2020) caracterizaram ainda uma mutação no gene *POL3* que causa uma substituição de aminoácido D270G na subunidade delta da DNA polimerase, e que essa mutação é responsável pelo fenótipo hipermutador da cepa ATCC 24067 de *Cryptococcus deneoformans*. Os autores afirmam a probabilidade de que esta mutação seja um fator importante na geração rápida de cepas microevoluídas (Boyce et al. 2020).

1.4. As vias BER e NER em fungos

A via de reparo de DNA por excisão de bases (BER, do inglês *Base Excision Repair*) é a via responsável pelo reconhecimento da integridade do DNA após lesões não-volumosas, geradas pela desaminação, oxidação ou metilação de bases (Bhakat et al. 2009; Hazra et al. 2007). Sítios abásicos e quebras de fita simples são as lesões mais comumente identificadas e reparadas pela BER. O início da via BER ocorre com o reconhecimento da lesão por enzimas DNA glicosilases, as quais iniciam o reparo pela hidrólise da ligação N-glicosídica entre o açúcar e a base danificada, gerando um sítio abásico, também chamado de sítio AP (sítio Apurinico/apirimidinico) (Krokan and Bjørås 2013a). Se o reparo for iniciado por uma glicosilase monofuncional, o sítio AP gerado é reconhecido por endonucleases Apurinica/apirimidinica (Apn) que catalisam a clivagem da ligação fosfodiéster, expondo um grupo 3'-hidroxil e o 5'-fosfato da desoxirribose (dRP) (Hanna et al. 2004a). Após a ação das AP-endonucleases, a via BER pode seguir por duas sub-vias, a via curta ou a via longa, dependendo da natureza da lesão, do tipo da DNA glicosilase que remove a base danificada, da cinética de competição entre as enzimas, bem como do nível de expressão das diferentes proteínas da via BER. O reparo é finalizado com a ação da DNA ligase I ou III selando a ligação fosfodiéster (Wallace 2014) (**Figura 3**).

Em células saudáveis, a maioria das quebras de fita simples (SSBs) vêm de espécies reativas de oxigênio (ERO) endógenas, e a via BER é a primeira linha de resposta à essas lesões. No contexto patogênico, a sobrevivência dos microorganismos dentro dos hospedeiros depende de mecanismos eficientes contra o *burst* oxidativo induzido por células fagocíticas (Bauernfeind and Hornung 2013; O. W. Liu et al. 2008; Upadhyaya et al. 2013b).

A atividade global da via BER pode mudar de acordo com o organismo. Em fungos, as etapas iniciais da via BER em *S. pombe* apresentam alterações em relação a *C. albicans* e *S. cerevisiae*, por exemplo. Em *S. cerevisiae*, os mutantes *apn1Δ* e *apn2Δ* são sinérgicos em relação à hipersensibilidade a MMS, com *apn1Δ* sendo responsável por mais de 90% da atividade AP-endonucleásica (Robert E Johnson et al. 1998). Diferente de *S. cerevisiae*, o mutante *apn1Δ* de *S. pombe* foi insensível a agentes genotóxicos, incluindo MMS, o que sugere que Apn1 não repara sítios AP em *S. pombe*, e a proteína Apn2 funciona predominantemente na remoção de lesões (Dindial Ramotar et al. 1998). Em *C. neoformans* a proteína Apn2 foi caracterizada de maneira generalista, em um estudo desenvolvido por Jung e colaboradores (Jung et al. 2015b). Jung demonstrou, por análise *in silico* dos domínios de atividade, que a proteína Apn2 apresenta atividade de fator de transcrição em *C. neoformans*. Entretanto, não foram realizados testes específicos quanto à sua atividade de reparo de DNA associada à Apn1.

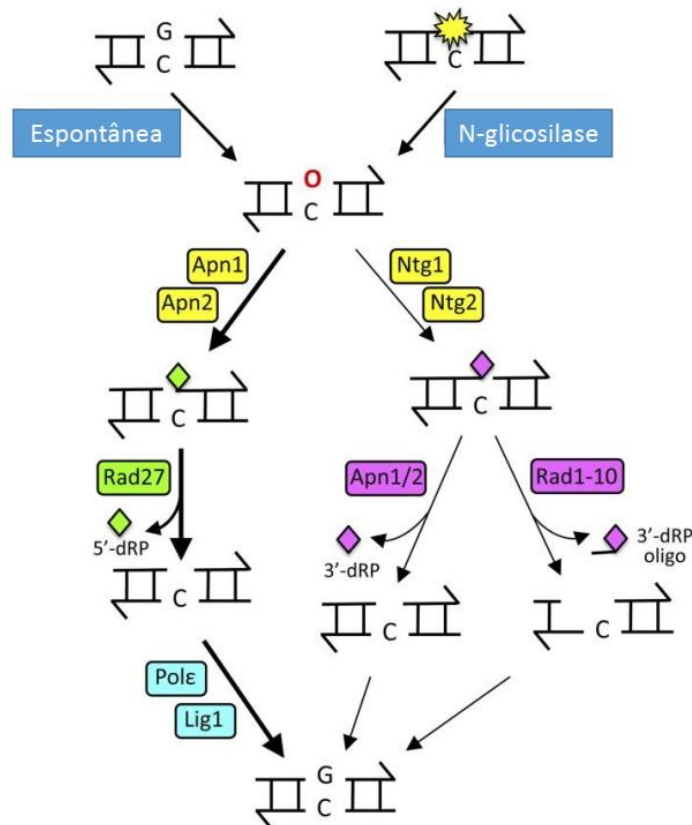


Figura 3. A via de BER de *S. cerevisiae*. Os sítios AP (“O” vermelho) são gerados por perda espontânea de base ou por atividade de uma N-glicosilase no DNA. Apn1 e Apn2 cortam o *backbone* na porção 5' de um sítio AP para iniciar o caminho principal para o reparo; o 5'-dRP resultante é removido pela endonuclease Rad27 5'-flap. O processamento do sítio AP também pode ser iniciado pela Ntg1 ou Ntg2, que cliva a fita na porção 3' da lesão. O 3'-dRP resultante pode ser removido pela atividade 3'-diesterase de Apn1 / Apn2 ou como parte de um oligonucleotídeo gerado por Rad1-Rad10. Finalmente, a lacuna é preenchida pela DNA Pol ε, e a estrutura é selada por DNA ligase 1. Adaptada de (Boiteux and Jinks-Robertson 2013a).

A via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER do inglês *Nucleotide Excision Repair*) é dividida em duas grandes vias, o reparo pela via NER pode ser genômico-global (GG-NER) ou acoplado à transcrição (TC-NER). A via GG-NER é iniciada quando são identificadas estruturas em bolha no DNA, geradas por problemas no pareamento de bases (Prakash and Prakash 2000). Já a via TC-NER tem seu início quando há o bloqueio da passagem da RNA polimerase II na fita que está sendo transcrita (Fousteri and Mullenders 2008). Após o reconhecimento das lesões, as vias GG-NER e TC-NER desencadeiam praticamente os mesmos processos na excisão de cerca de 24-32 nucleotídeos associados à lesão pelas proteínas Rad2 e RAD1-Rad10. A proteína replicadora (RPA) estabiliza a fita não lesionada enquanto a polimerase e ligase 1 preenchem o espaço vazio (Hanawalt 2003; Prakash and Prakash 2000).

Em leveduras, a via NER é realizada em várias etapas (Evert et al. 2004; Jung et al. 2015a). O primeiro passo é a ligação do complexo formado pelas proteínas Rad4-

Rad23 (Guzder et al. 1998; Min and Pavletich 2007). Este complexo é o responsável pela diferenciação entre DNA danificado e não danificado *in vitro*, e é a base de formação do complexo NER. Em seguida, o complexo Rad4-Rad23 recruta o Fator de Transcrição II H (TFIIH), responsável por desenovelar localmente o DNA, permitindo o recrutamento das endonucleases Rad2 e do heterodímero Rad1-Rad10 que promovem a incisão do DNA danificado (Drapkin et al. 1994; Guzder et al. 1995). Em seguida, as proteínas Rad14 e RPA se ligam ao ssDNA criado por TFIIH na tentativa de estabilizar o complexo de pré-incisão (O D Schärer and Schärer 2009; Staresincic et al. 2009). Por fim, uma DNA polimerase é recrutada para preencher a lacuna do ssDNA, seguida por uma DNA ligase fechando o *gap* da fita com a ligação fosfodiéster do DNA (Overmeer et al. 2010).

Nos fungos filamentosos, o papel da via NER na resposta a danos no DNA ainda não foi bem caracterizado. Abordagens genéticas destinadas a identificar componentes da via NER têm sido frustradas pela presença de vias NER redundantes. Um grande número de mutantes sensíveis à genotoxina foi isolado em *Neurospora crassa* e *Aspergillus nidulans* e, entre eles, ortólogos de genes NER (Hatakeyama et al. 1998; Yajima et al. 1995). No entanto, pesquisas nos bancos de dados de sequências de DNA de fungos disponíveis mostram claramente que os componentes do complexo de reparo da via NER são conservados em fungos filamentosos.

O fungo *C. neoformans* foi considerado uma espécie dominante em ambientes altamente radioativos, como as piscinas de resfriamento de reatores nucleares, a estratosfera e reatores nucleares danificados em Chernobyl (Jung et al. 2016a; Dadachova and Casadevall 2008). Embora algumas evidências apoiem o envolvimento da produção de melanina como mecanismo de resistência de *C. neoformans* à radiação, a participação de mecanismos de reparo de DNA também foi descrita (Y. Wang and Casadevall 1994; Dadachova and Casadevall 2008; Jung et al. 2016a). O estudo de genes afetados pela radiação gama por meio da análise do transcriptoma de todo o genoma identificou que os genes envolvidos nos sistemas de reparo de danos ao DNA foram regulados positivamente em resposta à radiação gama (Jung et al. 2016b). Particularmente, a deleção de recombinase RAD51 e de dois genes de ATPases dependentes de DNA, *RAD54* e *RDH54*, aumentaram a suscetibilidade celular à radiação gama e aos agentes que danificam o DNA (Jung et al. 2016a). Verma e colaboradores (2019) observaram que a ausência de determinados domínios da proteínas Rad23 influenciava a transcrição de genes envolvidos na virulência de *C. neoformans* (Verma, Shakya, and Idnurm 2019). A

caracterização de domínios específicos de Rad23 revelou que o domínio de ligação a XPC (Rad4) é necessário para resistência à radiação, mas dispensável para virulência.

S. pombe apresenta diferenças em sua resposta à radiação UV, em comparação com a levedura *S. cerevisiae* (Skoneczna, Kaniak, and Skoneczny 2015). Isso é explicado em parte pelo fato de *S. pombe* possuir uma via extra (UVER) para excisão de fotoprodutos UV, além do reparo por excisão de nucleotídeos (NER) (G. H. Goldman, McGuire, and Harris 2002; Skoneczna, Kaniak, and Skoneczny 2015). No início da década de 1990, a clonagem de homólogos de genes NER de *S. pombe* possibilitou a obtenção de mutantes com a deleção dos genes *RAD13*, *RAD15* e *RAD16* em *S. pombe*, mas, apesar da deficiência da via NER, os mutantes ainda foram capazes de reparar lesões UV (Takao et al. 1996; McCreedy, Carr, and Lehmann 1993). Anos mais tarde, estudos realizados por Bowman e colegas (1994) identificaram uma nova endonuclease com atividade de reparo de lesões UV, com capacidade de clivar os principais fotoprodutos, como dímeros de pirimidina (Bowman et al. 1994). Foi demonstrado que uma linhagem *S. pombe* mutante para a nova endonuclease UV e componentes da via NER, simultaneamente, foi completamente incapaz de reparar danos induzidos por UV (Yonemasu et al. 1997). Diante disto, os autores provaram a existência de uma segunda via de reparo por excisão para correção de lesões induzidas por UV em *S. pombe*, a resposta ao dano UV (UVDR) em que as enzimas UVDE (endonuclease de dano por UV) UVE1 ou UVDE desempenham papéis centrais.

Em situações em que múltiplas vias processam uma mesma lesão no DNA, a eliminação de uma via pode muitas vezes ser compensada por vias alternativas (PW et al. 2001; Swanson et al. 1999). As lesões que escapam ao processo de reconhecimento e correção adequados pela via NER podem ser reparados pela via BER (S. T, S, and S 2017; Swanson et al. 1999). As vias de reparo são especializadas e redundantes ao mesmo tempo, proporcionando uma maior cobertura do processo de correção das lesões, reduzindo assim a instabilidade genética. (S. T, S, and S 2017; Swanson et al. 1999; PW et al. 2001). Estudos com *S. cerevisiae* demonstraram que lesões oxidativas no DNA são processadas não apenas por BER, mas também por NER, recombinação e reparo da síntese de translesão (Swanson et al. 1999). A sensibilidade (morte celular) aos agentes oxidantes não é observada, a menos que várias vias sejam eliminadas simultaneamente. Esses dados sugerem que as vias de BER, NER e recombinação têm especificidades

sobrepostas na remoção ou tolerância a danos oxidativos exógenos ou espontâneos de DNA (Swanson et al. 1999).

A redundância dos sistemas de reparo de DNA pode ser comprovada por ensaios de laboratório. Não raramente, estudos com cepas mutantes de reparo de DNA projetadas resultam em pequenas ou nenhuma mudança nos fenótipos em comparação com cepas de tipo selvagem (Xiao and Chow 1998; Xiao et al. 2001; W. Yang 2011; Boiteux and Guillet 2004a; Hanna et al. 2004a; Melanie Legrand et al. 2008; Kondo et al. 2010). Esses resultados, se analisados apenas isolados, fornecem interpretações errôneas do padrão real de genes e vias específicas na sobrevivência da levedura e na resposta ao estresse. Estudos com *C. albicans* demonstraram que a interrupção dos genes BER *APN1*, *NTG1* e *OGG1*, bem como dos genes NER *RAD2* e *RAD10* não induziu mudanças significativas na morfologia das colônias, tempo de duplicação, filamentação ou produção de clamidósporos, em comparação com as cepas de tipo selvagem (Melanie Legrand et al. 2008). Em *S. cerevisiae* sem dois genes de endonuclease AP (*APN1* e *APN2*), a deleção de *NTH1* e *NTH2* suprimiu parcialmente a morte induzida por MMS (Collura, Auffret Van Der Kemp, and Boiteux 2012). A deleção simultânea de *NTH1*, *NTH2* e *OGG1* também foi necessária para suprimir o fenótipo letal do mutante *apn1Δapn2Δrad1Δ* (Guillet and Boiteux 2002). Em *S. pombe*, *mag1Δapn2Δ*, *mag1Δnth1Δ* e *mag1Δrad2Δ* duplo mutantes exibiram resistência a MMS aumentada em comparação com mutantes únicos *apn2Δ*, *nth1Δ* e *rad2Δ*, respectivamente, indicando o envolvimento de diferentes vias e proteínas no reparo de danos por alcilação (Alseth et al. 2005).

Em leveduras, as mutações nos genes *RAD1*, *RAD2*, *RAD4* e *RAD10*, da via NER, e no gene *APN1* da via BER, são sinérgicas em relação à morte por MMS, um agente de metilação que gera sítios AP no DNA (Xiao and Chow 1998). Outro estudo mostra que as mutações nos genes *RAD2*, *RAD4* e *RAD14* aumentam fortemente a sensibilidade ao MMS de cepas que possuem mutações nos genes *APN1* e *APN2* (Torres-Ramos et al. 2000). Embora muito sensíveis ao MMS, esses mutantes são viáveis (Torres-Ramos et al. 2000). Vias ou fatores independentes de MMR que podem processar alguns tipos de lesões do tipo *mismatch* no DNA são a via NER, algumas glicosilases da via BER, e a endonuclease FEN-1 (Kunz and Fleck 2001).

1.5. As AP-endonucleases

Enzimas AP endonucleases são caracterizadas por usarem a água para mediar a clivagem de ligações fosfodiéster, produzindo um *nick* de 5'-desoxiribose-5-fosfato (Hadi et al. 2002b). Esse mecanismo difere do realizado por glicosilase/liase que produz *nicks* com sítios abásicos insaturados, derivados da reação na porção 3' (Hadi et al. 2002b; Wallace 2014). Estudos moleculares e enzimáticos têm revelado que AP-endonucleases estão compreendidas em dois grupos filogenéticos, cada um incluindo membros procariotos e eucariotos (PW et al. 2001). As proteínas representantes de cada grupo são as duas AP endonucleases de *E. coli*: exonuclease III, codificada pelo gene *xth*, e endonuclease IV, codificada pelo gene *nfo*. A primeira enzima foi descoberta como uma exonuclease 3'-fosfatase, por isso foi nomeada exonuclease III. Posteriormente, foi detectada a atividade AP-endonucleásica equivalente à exonucleásica (Eisen and Hanawalt 1999). A enzima Endonuclease IV representa cerca de 5% de toda a atividade endonucleásica em *E. coli*, sob condições normais, mas a enzima é fortemente induzida em resposta ao estresse oxidativo (Eisen and Hanawalt 1999; Krokkan and Bjørås 2013b; Shinagawa 1996). Exonuclease III e endonuclease IV são estruturalmente não-relacionadas e se associam ao sítio AP do DNA de maneira diferente, mas produzem o mesmo produto após clivagem (Eisen and Hanawalt 1999; Hanna et al. 2004b).

A principal AP-endonuclease em *S. cerevisiae* é chamada Apn1 e é um homólogo relativamente próximo da endonuclease IV, mas com uma extensão C-terminal que contém uma sequência de localização nuclear (Fung and Demple 2005; Boiteux and Guillet 2006). Apn1 participa da via BER nos fungos, e mutantes deficientes desta enzima são hipersensíveis à agentes que geram sítios abásicos, ou outras lesões corrigidas pela via BER, como aquelas induzidas por H₂O₂ e agentes metilantes (Boiteux and Guillet 2004b). Uma segunda AP-endonuclease está presente em *S. cerevisiae* em menores níveis: a proteína Apn2/Eth1 (Ildiko Unk et al. 2000). Essa enzima é bem menos ativa, quando comparada à Apn1 e funciona como um *backup* para a atividade de reparo, ou pode atuar em alguma via alternativa não descrita (Ildiko Unk et al. 2000; D Ramotar et al. 1993).

A enzima predominante em células de mamíferos pertence à família exonuclease III, e é usualmente conhecida como APEX ou APE1. A proteína APE1 contém aproximadamente 280 resíduos homólogos à exonuclease III, com ~ 60 resíduos de extensão na porção N-terminal que contém o sinal de localização nuclear (M. Li and

Wilson 2014a; Wilson and Barsky 2001; Tell et al. 2009). APE1 é uma AP-endonuclease robusta, ainda mais ativa que sua contraparte bacteriana, e age em uma variedade de sítios (M. Li and Wilson 2014a; Izumi et al. 2000; Hazra et al. 2007; Vascotto et al. 2009; G et al. 2009). A proteína humana foi capaz de reestabelecer a função AP-endonucleásica em organismos deficientes de diferentes espécies, como *E. coli* e *S. cerevisiae*. O estabelecimento da atividade de APE1 na via BER dos mamíferos foi inicialmente dificultada pela inviabilidade dos mutantes deletados para APE1 (*APE1* KO) (M. Li and Wilson 2014a; Wilson and Barsky 2001). A exclusão o gene *APEX* causa letalidade embrionária em camundongos, o que reforça a importância dessa proteína (Evans, Limp-Foster, and Kelley 2000). O uso da tecnologia de RNA de interferência (RNAi) e técnicas de expressão condicional de genes permitiram a caracterização da atividade de reparo de DNA de APE1 como essencial em células humanas (M. Li and Wilson 2014b). Essa observação contrasta com os dados obtidos para micro-organismos, onde mutantes sem AP-endonuclease são totalmente viáveis (Xiao and Chow 1998; Boiteux and Guillet 2004a).

APE1 também participa do processamento de RNA e da regulação redox celular, reduzindo resíduos conservados em fatores de transcrição, tais como AP-1, p53, NF- κ B, HIF1- α , Erg-1, Myc e membros da família ATF/CREB, aumentando assim a afinidade ao DNA (Pejanovic et al. 2012; Okazaki et al. 1994; Jedinak et al. 2011; S et al. 2011; Amente et al. 2010; Janzer et al. 2012). Por participar de mecanismos celulares importantes, a atividade de APE1 sofre regulação por diferentes vias. A transcrição de APE1 é responsiva à estímulos, como níveis de estresse oxidativo celular, hormônios responsivos ao cálcio e citocinas inflamatórias, como NF-kB (Sengupta et al. 2011). Ambientes celulares modificados por condições que geram espécies reativas de oxigênio, por exemplo, promovem uma indução da transcrição e tradução de APE1, as quais se relacionam diretamente com o aumento de suas atividades redox e de endonuclease (Pines et al. 2005; Tell et al.). A produção e indução da atividade de APE1 portanto é associada diretamente a necessidade de sua atividade para restauração do equilíbrio das funções celulares.

Estudos em *Trypanosoma* revelaram que a endonuclease AP (TBAPE1) derivadas de tripanossomos de corrente sanguínea, não é essencial para a viabilidade neste tipo de célula em condições de cultura *in vitro*. A TBAPE1 participa da remoção de sítios AP visto que houve uma correlação inversa entre o nível de endonuclease AP na célula e

o número de sítios abásicos gerados endogenamente em seu DNA genômico (Charret et al. 2012). Além disso, a depleção de TBAPE1 torna as células hipersensíveis ao sítio AP e aos agentes indutores de quebra de fita, como metotrexato e fleomicina, respectivamente, mas não a agentes alquilantes (Charret et al. 2012). Os autores demonstraram também o aumento da suscetibilidade das células mutantes sem a proteína TBAPE1 ao óxido nítrico, o que sugere um papel essencial para esta enzima de reparo de DNA na proteção do patógeno contra as defesas imunológicas do hospedeiro mamífero (Charret et al. 2012).

A maior AP-endonuclease em *Saccharomyces cerevisiae* é chamada Apn1 e é um homólogo relativamente próxima da endonuclease IV/nfo de *E. coli*, mas com uma extensão C-terminal que contém uma sequência de localização nuclear. Apn1 participa da via BER nos fungos, e mutantes deficientes para esta enzima são hipersensíveis à agentes que geram sítios abásicos, ou outras lesões corrigidas pela via BER, como H₂O₂ e agentes metilantes. Uma segunda AP-endonuclease está presente em *S. cerevisiae* em menores níveis: a proteína Apn2/Eth1. Essa enzima é bem menos ativa, quando comparada à Apn1 e funciona como um backup para a atividade de reparo, ou ainda atuar um alguma via alternativa ainda não descrita. Ambas APN1 e Apn2 de *S. cerevisiae* possuem atividades de AP-endonuclease e 3'fosfodiesterase (I Unk et al. 2000), entretanto desempenham papéis distintos.

Diferente dos mutantes *apn1*Δ, os mutantes *apn2*Δ de *S. cerevisiae* exibem sensibilidade normal ao metanossulfonato de metila (MMS) e não mostram aumento nas taxas de mutação espontânea, sugerindo um papel menos proeminente no reparo dos sítios AP (Popoff et al. 1990; Bennett 1999; Ildiko Unk et al. 2000). Estudos com *Candida albicans* revelaram que Apn1 possui uma participação menor na suscetibilidade a agentes que danificam o DNA e na resposta aos medicamentos (Melanie Legrand et al. 2008). A função de Apn1 de *C. albicans* ainda não está clara. Em *Schizosaccharomyces pombe*, diferentemente de *S. cerevisiae*, a proteína Apn2 resolve aproximadamente 90% das lesões abásicas na via de BER (Ribar, Izumi, and Mitra 2004). O Apn2 de *S. pombe* é filogeneticamente mais próximo das proteínas APE humanas e possui domínios importantes envolvidos nas interações proteína-proteína (Sipiczki 2000; Ribar, Izumi, and Mitra 2004).

Estudos com *C. albicans* demonstraram o papel crucial de enzimas de reparo de DNA na patogenicidade. Chauhan e colaboradores (2005) observaram que fungos mutantes para os genes Rad52 *-/-*, comprometidos no reparo por recombinação homóloga, e lig4*-/-*, no reparo *non-homologous end joining*, foram avirulentos em modelos de candidíase sistêmica em murinos (Chauhan et al. 2005). Além disso, foi demonstrado que a expressão de diversos genes envolvidos no reparo de DNA foi induzida após exposição a macrófagos *ex vivo* (Lorenz, Bender, and Fink 2004). Contudo, em trabalho posterior, Legrand e colaboradores (2005) observaram que *C. albicans* mutados para genes da via BER de reparo (apn1 *-/-*, ntg1*-/-* e ogg1 *-/-*) não apresentaram hipersensibilidade à exposição a H₂O₂, ou a macrófagos, o que suscita a necessidade de maiores estudos acerca da importância das vias de reparo de DNA para a patogenicidade do fungo (Melanie Legrand et al. 2008).

Magditch e colaboradores (2012) estudaram o envolvimento de mutações nas alterações fenotípicas e microevolução de *C. neoformans*. Neste trabalho, os autores observaram uma relação entre o fenótipo pseudohifa e mutações em genes da via RAM (do inglês *Regulation of Ace2p activity and cellular Morphogenesis*). Foi observado que linhagens com mutação no gene MOB2, derivadas de cultivo em amebas, foram incapazes de causar doença em modelos murinos. Esses resultados elucidam como as mutações no DNA podem contribuir para a patogênese de *C. neoformans* (Magditch, Liu, Xue, and Idnurm 2012). Contudo, não foram estudados os impactos da atividade de reparo de DNA na formação de mutações.

Apesar da observada importância das vias de reparo para a adaptação de fungos patogênicos, pouco é conhecido acerca dos sistemas de reparo de *C. neoformans*. A capacidade de sobrevivência em diferentes condições ambientais, a diferenciação fenotípica em resposta ao ambiente, e a resistência ao estresse oxidativo no interior de macrófagos reforçam o interesse acerca dos mecanismos de reparo de DNA de *C. neoformans* e a sua relação com a adaptação ao ambiente e patogenicidade.

2. Justificativa

O conhecimento aprofundado dos mecanismos de adaptação e virulência do patógeno humano *C. neoformans* é de considerável importância para o desenvolvimento de abordagens aos quadros de infecção por este patógeno. A capacidade de habitar e se adaptar a diferentes nichos sugere que *C. neoformans* possua mecanismos de geração de

variabilidade genética apurados. Dentre esses mecanismos descritos, o sistema de reparo de DNA possui papel importante na regulação da geração de mutações e alterações genéticas, já relacionadas à modulação da virulência em outros patógenos. Dentre os sistemas de reparo de DNA, o sistema de reparo por excisão de bases é o responsável pela correção de lesões induzidas por estresse oxidativo, mecanismo importante de defesa dos hospedeiros. Apesar de grande importância para o entendimento do patógeno, pouco é conhecido acerca dos sistemas de reparo de DNA de *C. neoformans*, bem como acerca da relação entre estes sistemas e os mecanismos de sobrevivência, resistência a drogas e virulência deste patógeno. A carência de informações na área fundamenta a importância do estudo do reparo de DNA de *C. neoformans* e da sua relação com a sobrevivência, adaptação e virulência fúngica.

3. Objetivo geral e específicos

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar componentes da via BER de reparo de DNA e avaliar suas implicações na resposta ao estresse oxidativo e genotóxico, bem como na virulência e resistência a drogas em *C. neoformans*.

Objetivos específicos

1. Identificar *in silico* Ap-endonuclease 1 e AP-endonuclease 2 hipotéticas de *C. neoformans* através da análise bioinformática de sequências e domínios;
2. Construção dos cassetes de deleção e obtenção dos mutantes para *APN1* e *APN2* em *C. neoformans*;
3. Avaliar o papel dos genes *APN1* e *APN2* na resposta a agentes indutores de estresses osmótico, de parede celular, oxidativo e drogas genotóxicas em *C. neoformans*.
4. Analisar o envolvimento dos genes *APN1* e *APN2* na produção de atributos de virulência por *C. neoformans*, e para a virulência do fungo em modelos *in vitro* e *in vivo*;
5. Caracterizar a participação de Apn1 e Apn2 de *C. neoformans* na resposta as drogas antibióticas Flucitosina, Anfotericina B, Terbinafina, 5-flucitosina e Zeocina;
6. Avaliar a importância do gene de reparo de DNA *XPC* de *C. neoformans* através da obtenção e análise de mutantes deletados.

4. Materiais e métodos

4.1. Linhagens

Para este estudo foi utilizada as linhagens H99 de *C. neoformans var. grubii* (sorotipo A) (gentilmente doada pelo Prof. J. Andrew Alspaugh, *Duke University, Durham, NC, USA*) como organismo base para geração de mutantes para os genes de reparo de DNA, listados na **Tabela A1**, para análises subsequentes. As cepas fúngicas selvagem e mutantes foram estocadas à -80 °C em meio YPD contendo glicerol 35%. As leveduras foram cultivadas em placas contendo YPD ágar (extrato de levedura - peptona – dextrose / 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose e 1,5% de ágar pH 5,6) e incubadas a 30 °C, salvo indicação em contrário. Colônias únicas foram inoculadas em YPD líquido e crescido durante a noite a 30 °C, sob agitação (150 rpm). Antes dos experimentos, as células foram centrifugadas a 4000 rpm e lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1 × para remover o meio de cultura.

4.2. Anotação, classificação e seleção dos genes de vias de reparo de *C. neoformans*.

A anotação dos genes de reparo de DNA de *C. neoformans* foi realizada a partir de busca de sequências no banco de dados genômicos: *Broad Institute of MIT and Harvard* (<https://www.broadinstitute.org/fungal-genome-initiative>, acessado em 11 de fevereiro de 2021) e *FungiDB* (<http://fungidb.org/fungidb/>, acessado em 11 de fevereiro de 2021) e *NCBI* (National Center for Biotechnology Information) base de dados (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>, acessado em 11 de fevereiro de 2021). As sequências de aminoácidos de AP-endonucleases previamente identificadas de *S. cerevisiae* (ASP85051.1), *S. pombe* (NP_595522.1), *C. albicans* (KHC89247.1) e *Homo sapiens* (AAD43041.1) nos domínios *Broad Institute* e *FungiDB*.

A escolha dos genes alvos deste estudo foi feita com base na análise da literatura. Os genes foram elencados de acordo com sua relevância para funcionamento geral do reparo de DNA, sendo selecionados aqueles que codificavam proteínas com atividade na via BER de reparo de DNA de outros organismos. A análise inicial foi realizada por bioinformática empregando ferramentas de alinhamento de sequências na busca por homólogos no banco de dados do genoma de *C. neoformans*.

Para identificação das similaridades entre os genes pré-selecionados nas análises iniciais do banco de dados e os genes de reparo já descritos, foi realizado o alinhamento das sequências gênicas usando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search*

Tool), disponível no domínio <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>, (acessada em 11 de fevereiro de 2021). Os indicadores de similaridade foram analisados em relação às sequências de DNA, bem como de aminoácidos das proteínas codificadas. As sequências de aminoácidos foram analisadas com a ferramenta de alinhamento múltiplo CLUSTAL Omega (disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para uma análise mais refinada dos domínios conservados e estrutura das proteínas. Com base nos dados da literatura, os genes de reparo de DNA mais estudados e cujos homólogos foram selecionados para nocaute em *C. neoformans* foram: DNA liase de sítiosapurínicos/apirimidínicos (Apn1 – CNAG_05468), Apn2/Exodeoxiribunuclease III (Apn2 - CNAG_04268), e *Xeroderma Pigmentosum group C-complementing protein* XPC (CNAG_01338).

4.3 Construção de cepas de fungos deletadas para genes de reparo de DNA.

As linhagens mutantes para os genes de reparo foram obtidas através da técnica de PCR Dupla-junta para substituição da ORF (*Open Reading Frame*) de cada gene de interesse por cassetes de deleção contendo genes dominantes de resistência a antibióticos (Kim *et al.*, 2009). Para tanto, cassetes de deleção foram sintetizados contendo uma marca de resistência a antibióticos (neomicina, nurseotricina ou Higromicina B) com regiões flangeadoras adjacentes de cada gene de interesse. Com a inserção do cassete no organismo, as regiões flangeadoras do gene sofrem recombinação homóloga com aquelas, presentes no cassete de deleção, e incorporam o cassete no *locus* do gene de interesse, substituindo o gene pelo cassete. Para a construção do cassete foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para o reconhecimento e amplificação de fragmentos específicos da região gênica e flangeadora de interesse.

Para a construção dos cassetes de deleção os fragmentos iniciais, denominados 1+2, 3+4, 5+6 e 7+8 foram amplificados por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos (**Tabela A2**). A amplificação dos fragmentos foi utilizada a Enzima FAST DNA polimerase segundo informações do fabricante (Fermentas), sendo DNA genômico de H99 usado para a amplificação dos fragmentos 1+2 e 7+8; DNA plasmidial pPZHyg (M. S. Kim *et al.* 2009) para os fragmentos 3+4 e 5+8 para o cassete de *APN2*; DNA plasmidial pZPNAT ((M. S. Kim *et al.* 2009) para os fragmentos 3+4 e 5+8 para o cassete de *APN1* ou *XPC* (**Figura 4**).

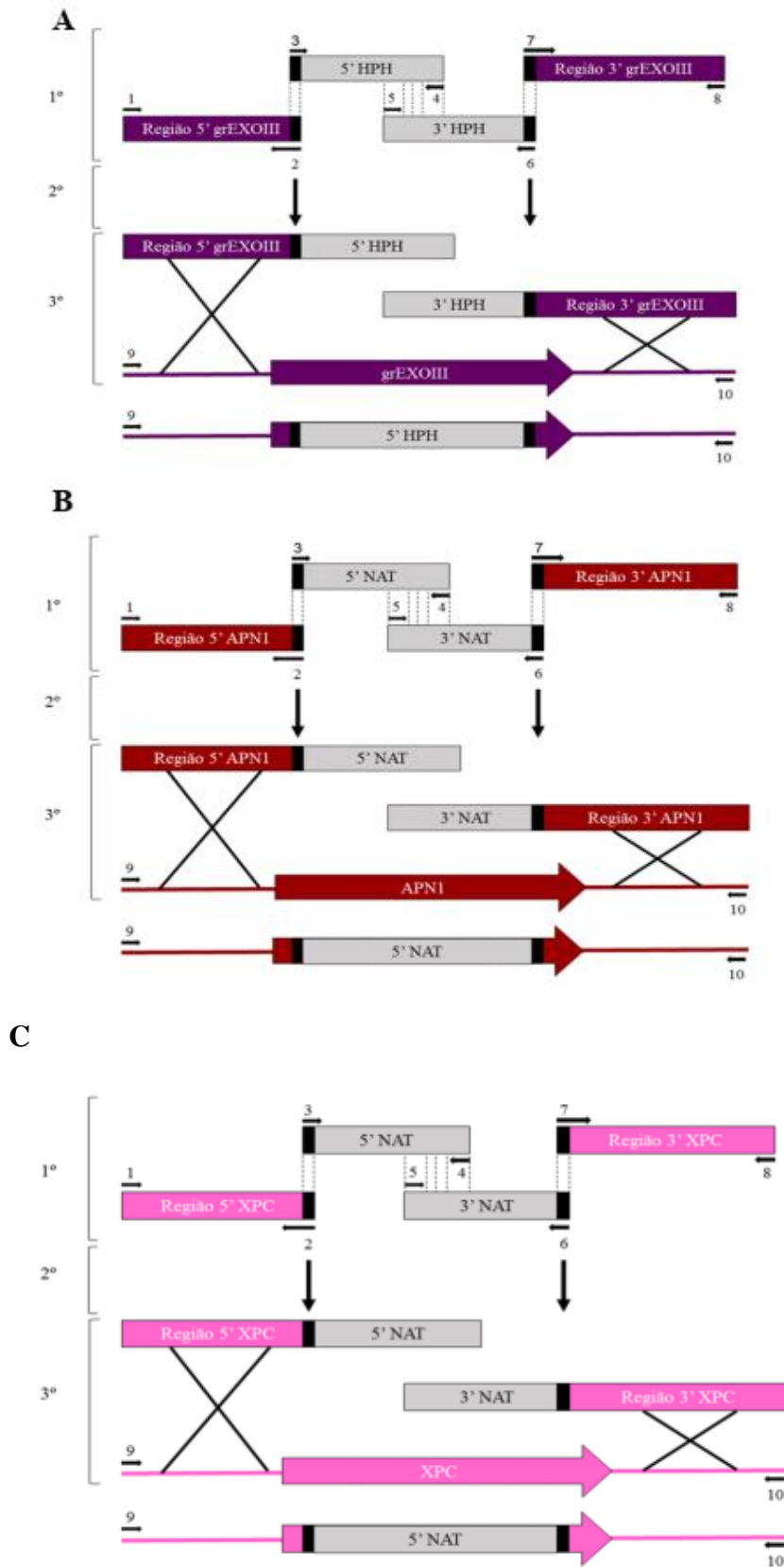


Figura 4. Representação esquemática das etapas para formação dos cassetes para deleção de via BER. A- Fragmentos e primers para deleção do gene *APN2*; B- Fragmentos e primers para deleção do gene *APN1*. NATnurseotricina; HPH-higromicina; C) Fragmentos para deleção do gene *XPC*.

A inserção dos cassetes no fungo foi realizada por biobalística (M. S. Kim et al. 2009). Fungos provenientes de colônia jovem foram crescidos em 100 mL de YPD, a 30 °C, sob agitação (150-200 rpm), por 24 h em frascos estéreis de 250 mL. Decorrido o tempo, a suspensão de fungos foi centrifugada a 4.000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 50 mL de solução salina (NaCl estéril 0,9%) para nova centrifugação. Após a lavagem, as células foram ressuspensas em volume ideal de salina de acordo com a proporção de 1 mL por placa de transformação. As placas de diâmetro de 90 mm submetidas à biobalística continham meio YPD ágar suplementado com sorbitol 1M como estabilizador osmótico. As células foram espalhadas nas placas de transformação e deixadas por cerca de 2 h em fluxo laminar para evaporação da água.

Os fragmentos de DNA (2 µg de DNA total) correspondentes aos cassetes de deleção foram quantificados. Para construção das cepas reconstituídas a proporção das quantidades do cassete de reconstituição e do plasmídeo PJAF1 (contendo marca de resistência a neomicina) foi de 3:1. Partículas de tungstênio M10 (0,7 µm, BioRad), carreadoras das moléculas de interesse para a biobalística, foram preparadas para acomodar o DNA como se segue. Inicialmente os aglomerados de partículas em suspensão foram desfeitos por incubação em banco sonicador durante 7 min, e homogeneizadas por agitação intensa em vórtex mecânico por dois min à velocidade máxima. Em seguida, o DNA foi associado às partículas pela incubação conjunta da solução de DNA, 50 µL de partículas, 20 µL de solução de espermidina a 100 mM e 50 µL de CaCl₂ a 2,5 M, por 10 min, sob agitação leve em vórtex a baixa velocidade. Em seguida, a solução foi centrifugada à velocidade máxima por 10 min, o sobrenadante foi descartado e as partículas foram ressuspensas em 150 µL absoluto e homogeneizadas cuidadosamente. A suspensão foi centrifugada e o processo repetido mais duas vezes. Após última lavagem, as partículas foram então ressuspensas em volume adequado de etanol absoluto de acordo com a proporção de 4 µL de partícula para cada membrana balística/ ou placa de transformação. As partículas foram distribuídas em membranas acopladas a discos carreadores segundo instruções do fabricante (BioRad), no volume de 4 µL de partícula por membrana, e secadas em recipiente contendo sílica-gel por cerca de 40 min.

Recuperação de mutantes: a transformação dos fungos se deu de acordo com instruções do fabricante, e cada placa de transformação foi incubada a 30 °C, por 48 h,

protegidas da luz. Decorrido o tempo, os fungos foram removidos da placa através de lavagem com água estéril e transferidos para placas de seleção de 150 mm contendo YPD ágar suplementado com o antibiótico referente à marca de seleção usada no cassette (higromicina para *APN2* e *XPC*, nurseotricina para *APN1*, e neomicina para reconstituídos, ambos a 200 µg/Ml), na proporção de uma placa de seleção para cada placa de transformação. As placas de seleção foram incubadas a 30 °C, por três a sete dias, para formação de colônias. As colônias formadas foram transferidas para placas contendo novo meio de seleção para análise de estabilidade mitótica. Após 48h, as colônias vivas foram selecionadas para extração de DNA e confirmação de deleção.

4.4.Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada conforme protocolo *Smash-and-Grab*. Para tanto, fungos foram crescidos em 5 mL YPD, a 30 °C por 24 h em tubos estéreis de polipropileno com tampa, sob agitação constante (150-200 rpm por min). As células foram separadas do meio de cultura por centrifugação a 4.000 rpm por 5 min e ressuspensas em 1,5 ml de água estéril. A suspensão de células foi transferida para tubos de polipropileno de 2 ml e novamente centrifugadas, agora em centrífuga de microtubos a 5.000 rpm por 5 min. Após remoção do sobrenadante, às células foram adicionadas pérolas de vidro (Sigma-Aldrich, 0,45 mm de diâmetro) até a marca aproximada de 250 µL do tubo, e 500 µL de tampão TENTS. Os sistemas foram agitados em vórtex a velocidade máxima por dez minutos, para quebra mecânica das células, seguida de centrifugação a 12.000 rpm por 10 min. Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida por pipetagem para um novo tubo e à ela acrescentados 50 µL acetato de sódio 3 M e 1 ml de etanol absoluto. Os tubos foram homogeneizados por agitação e centrifugados a 10.000 rpm por 15 min para separação do DNA. Após descarte do sobrenadante, o DNA precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 70% e novamente centrifugado. O etanol foi descartado e o tubo contendo o DNA foi mantido aberto em fluxo laminar por 5 min para evaporação do etanol restante, antes da adição de 100 µL de água contendo RNase A (1:100 *Roche Applied Science*). A amostra foi incubada por 1 h a 37 °C para total solubilização da molécula de DNA e eliminação de RNA pela enzima RNase A, e em seguida estocada a -80 °C.

4.5. Confirmação da deleção e reconstituição dos loci *APN1*, *APN2* e *XPC* por PCR e Southern Blot.

Após confirmação prévia da inserção do cassete de deleção através da técnica de PCR, o DNA dos fungos construídos foi submetido à nova análise para avaliação da integridade e correto posicionamento do cassete no *locus* desejado. Foi usado o método Southern-Blot para detecção de DNA mediado por sonda (**Figura 5**). Para a técnica, oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para a construção de fragmentos sondas, marcados com dioxigenina e pareáveis com sequencias específicas contidas nos *locus* de cada gene analisado, e a revelação realizada através da hibridização de anticorpos específicos.

Digestão do DNA genômico: O DNA genômico do fungo mutante *apn1Δ* e do selvagem foi extraído, como descrito anteriormente, purificado e quantificado. Um total de vinte microgramas de cada DNA foram digeridos pela atividade das enzimas de restrição SacI e StuI, usadas na proporção de duas unidades por micrograma de DNA.

Preparo da Sonda: A sonda para análise do Southern (amplicon da região 3' do locus *APN1*, contendo ~800 pb) (Figura 3) foi sintetizada por PCR conforme descrição:

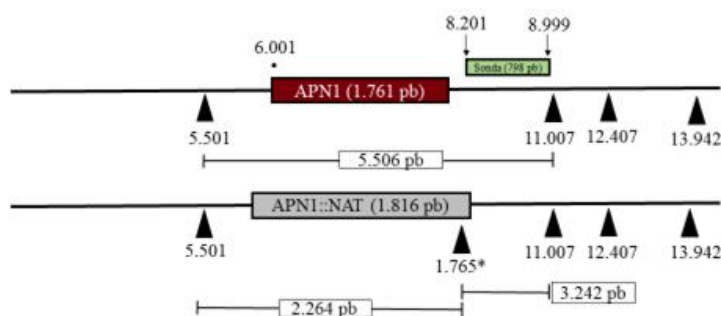
| Reação de PCR (Roche) | | | |
|------------------------------|--------|----------------------------|-------------|
| Tampão | 5 x | | |
| dNTPs DIG (Roche) | | Programa de PCR | |
| DIG-UTP (Roche) | | 94 °C | por 30 s |
| Primer <i>APN1</i> _Sonda | 0,2 μM | 94 °C | por 25 s * |
| Primer <i>APN1</i> _P8 | 0,2 μM | 56 °C | por 30 s * |
| DNA genômico de H99 | 40 ng | 68 °C | por 1 min * |
| Enzima OneTaq DNA polimerase | 1,5 U | 68 °C | por 5 min |
| H ₂ O q.s.p. | 50 μL | Preservação a quatro graus | |

*Fases repetidas por 35 ciclos.

A

Sal I

A enzima corta a sequencia contida no marcador // expansão 6.000pb



* Contagem no gene NAT ; corresponde a posição 7.765 no genoma Cn na expansão de 6.000 pb

Primers sonda

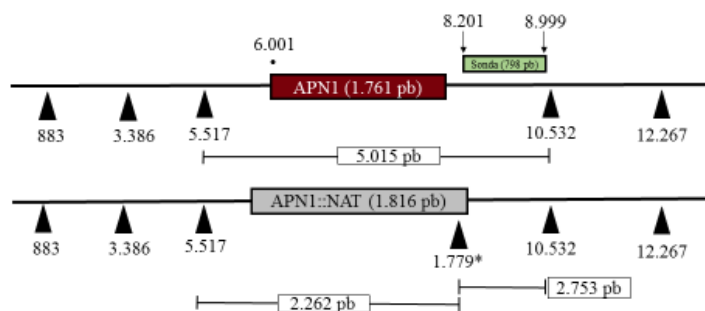
*P1S = TCT TTT GAC TGT CTG CAC GC

P10_APN1= GCA TGA CAA CTT TCC CCT AGC

B

Stu I

A enzima corta a sequencia contida no marcador // expansão 6.000pb



* Contagem no gene NAT ; corresponde a posição 7.779 no genoma Cn na expansão de 6.000 pb

Primers sonda

*P1S = TCT TTT GAC TGT CTG CAC GC

P10_APN1= GCA TGA CAA CTT TCC CCT AGC

Figura 5 Representação esquemática dos sítios de reconhecimento e clivagem das enzimas SalI (A) e StuI. (B). As enzimas foram usadas para digestão do DNA e confirmação da deleção de *APN1* através da técnica de hibridação de sondas por Southern Blot. Os sítios são identificados pelas pontas das setas

Separação dos fragmentos digeridos por eletroforese: O DNA digerido foi aplicado e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE. As amostras de DNA digerido, juntamente com o marcador de peso molecular (BioLabs) e a sonda foram submetidos à eletroforese a 2 V/cm por cerca de 3 h. Decorrido o tempo, o gel foi alinhado à uma régua, fotografado para análises posteriores, e preparado para o processo de transferência para a membrana. A preparação do gel consiste na imersão do mesmo em soluções, a saber: Solução depurinadora (HCl a 125 Mm) por 10 min, solução desnaturadora por 30 min e solução neutralizadora por mais

30 min. Após o tratamento, o gel foi acoplado a um sistema de transferência capilar ascendente, onde foi usada a capilaridade do tampão SSC 20X como força para migração do DNA do gel para uma membrana de poliamida alifática carregada positivamente (HyBond N+, Ge Life Science). *Pré-processamento da membrana:* A membrana foi retirada do sistema de transferência e o DNA fixado na mesma por exposição à radiação UV segundo ciclo otimizado em aparelho Stratalinker (Agilent). Em seguida, a membrana foi transferida para garrafas de vidro e pré-hibridizadas em tampão de hibridação a 50 °C por 30 min em forno giratório.

Processamento da membrana: À garrafa contendo a membrana e o tampão de hibridação foi adicionada a sonda previamente fervida, em quantidade determinada de acordo com o manual do fornecedor, e incubada por uma noite a 50 °C, em forno giratório.

Procedimentos para revelação: a membrana foi lavada segundo o manual, à temperatura ambiente, a detecção foi feita pelo aparelho LAS4000 (GE) e a visualização através do programa Image Quant LAS4000.

4.6. Curva de crescimento

As leveduras foram contadas em câmara *Neubauer* e a densidade celular ajustada para 10^5 células/mL em meio YPD pH 5,6. A suspensão de células foi aplicada em placas de 96 poços, na concentração final de 1×10^4 cél/poço em meio YPD, sob constante agitação. As células foram crescidas nas condições de 30 °C ou 37 °C e 150 rpm. A densidade ótica foi mensurada a cada 30 min a 600 nm no espectrofotômetro *Eon Biotek* (*BioTek Eon Microplate Spectrophotometers, Winooski, VT, United States*) por 96 h totais. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas experimentais.

4.7. Avaliação fenotípica dos mutantes.

Todos os ensaios fenotípicos e suas replicatas foram realizados usando colônias provenientes do descongelamento e semeadura das cepas em meio YPD sólido pH 5,6 (48 h, 30 °C) a partir de estoque a -80 °C. Colônias jovens dos fungos mutantes e selvagem foram crescidas em meio YPD líquido pH 5,6, a 30 °C, sob agitação por 24 h, antes de qualquer ensaio de avaliação fenotípica. Antes de qualquer experimento, as células foram lavadas com PBS e a densidade celular foi ajustada após contagem com câmara *Neubauer*.

Para análise da viabilidade celular, 10^6 células/mL foram crescidas em YPD líquido por 48 h e quantificadas por meio de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Para ensaio de UFC, as leveduras foram crescidas em meio contendo diferentes agentes de interesse conforme desenho experimental. Foram realizados ensaios de diluição seriada (500, 5.000 ou 50.000 vezes) para cada condição testada e foram inoculados 100 μ L da suspensão em YPD ágar, seguidos de crescimento a 30 °C por 48 h para contagem de colônias. Para experimentos qualitativos de avaliação de sensibilidade fenotípica, suspensões de fungos foram preparadas seguindo diluições seriadas, iniciadas em 10^5 até 10^2 células por ponto em um volume de 5 μ L. As placas contendo as diluições foram incubadas a 30 °C ou 37 °C conforme desenho experimental por 48 h para posterior avaliação. Foram consideradas sensíveis à alguma condição linhagens que apresentaram diferenças de crescimento de, pelo menos, uma diluição em relação ao controle de crescimento em YPD.

Atributos de virulência: A produção de atributos de virulência, tais como a capacidade de produzir melanina, fosfolipase e urease foi avaliada em placas de 6 poços contendo os meios de cultura indutores L-DOPA (1 mM), ágar gema de ovo e *Christensen's*, respectivamente. Ensaio de atividade de urease e melanina foram executados em meio ágar (sólido) e meio líquido para comparação de condições. Inóculos iniciais de 10^6 células/mL foram aplicados em poços isolados em cada placa e incubados a 30 °C ou 37 °C por 48 h ou 72 h.

A produção de melanina foi induzida em meio mínimo líquido e sólido contendo L-DOPA 1 mM (Sigma-Aldrich). O total de 10^6 células / ml foi adicionado à cada poço da placa de 24 poços e incubado à 30 °C / 150 rpm protegidas da luz. A quantidade de melanina foi aferida diariamente de acordo com a cor da suspensão, tão mais escura quanto maior o acúmulo do pigmento.

A produção de cápsula foi induzida em meio mínimo pH 5,5 quimicamente definido, acrescido de tiamina (3 μ M). A suspensão celular foi aliqüotada em placas de 24 poços e incubados a 30° C a 150 rpm por 24h. Para mensuração do tamanho real da cápsula, foram adicionados 5 μ L da suspensão celular a 5 μ L de nanquim (Becton Dickinson, NJ) em lâmina para microscopia e, em seguida, analisada em microscópio de Luz (Axiovert 100, Carl Zeiss), sob aumento de 35x. Campos aleatórios da lâmina foram fotografados. A medida da cápsula foi obtida através da subtração dos diâmetros total da

célula e do corpo celular, usando o programa ZEN blue edition 2.3. O mínimo de 60 células foi contado para cada condição de tratamento analisada.

Para as análises de atividades de fosfolipase ou urease, 10^6 células foram colocadas em Meio Agar de emulsão de ovo ou em ágar uréia de *Christensen* (0,1% peptona, 0,5% NaCl, 0,2% KH_2PO_4 , 0,1% de glicose, 2% de ureia, 0,0016% de vermelho de fenol), respectivamente, e incubado por 72 h a 30 °C. A atividade da fosfolipase (Pz) foi medida pela proporção do diâmetro da colônia (DC) para o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (DCP). $Pz = 1 =$ sem atividade; $1 > Pz > 0,63 =$ atividade de fosfolipase [Price et al., 1982]. A atividade da urease foi analisada pela mudança da cor do meio de cultura (*Christensen's*), de amarelo a rosa, sendo rosa a tonalidade alcançada pela atividade da enzima uréase.

Resistência a estressores: As leveduras foram diluídas e aplicadas em densidades que variaram de 10^7 a 10^2 células em placas contendo YPD ágar contendo diferentes compostos como H_2O_2 (1 mM e 5 mM) e Menadiona (0,03 mM) (estresse oxidativo), Cafeína (0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL) (estressores de parede celular), detergente SDS 0,05 % (estressor de membrana plasmática), KCl 1,5 M e NaCl 1,5 M (estressores osmóticos) e à radiação UV (indutor de danos ao DNA). A capacidade de crescimento dos fungos a 30 °C ou a 37 °C por 48 h foi a variável considerada para avaliar a resistência ou sensibilidade aos estressores.

4.8. Análise de sobrevivência

Para análise da capacidade de sobrevivência e demais testes de avaliação de fenótipos, as linhagens ressuspensas em YNB foram lavadas usando PBS 1x e centrifugadas para contagem. As células foram contadas em câmaras Neubauer (usando corante azul de tripano para avaliação da viabilidade após tratamento) e a concentração celular foi ajustada para diluições de 10^7 a 10^2 células por ponto, em placas contendo YPD ágar. A capacidade de crescimento foi avaliada conforme a formação de colônia (s) nos pontos de diluição após incubação em estufa 30 °C, por 48 h.

4.9. Teste de crescimento na presença de H_2O_2

Um total de 10^5 células por mL foi diluído em meio YPD pH 5,6 contendo 1 mM, 3 mM e 5 mM de H_2O_2 em placas de 96 poços. As linhagens de leveduras foram incubadas em temperatura de 30 e 37 °C e a densidade óptica (DO) de cada poço foi determinada por espectrofotometria (EON Microplate, Biotek Inc), no comprimento de onda de 600 nm a

cada 12h. As médias das DO referentes ao crescimento de cada linhagem foram analisadas e a razão entre mutante e selvagem foi plotada em um mapa de calor com seus respectivos desvios. A coloração vermelha indica as amostras com menor crescimento em relação às leveduras que não receberam tratamento, enquanto a coloração verde representa maior crescimento. A análise estatística foi realizada com o teste *t-student*.

4.10. Ensaio de fagocitose *in vitro*

Aproximadamente 5×10^4 BMDMs foram colocados em cada poço de microplacas de poliestireno de 96 poços, contendo 100 μ L de meio RPMI suplementado com FBS a 10%. As culturas foram incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. O sobrenadante foi removido e $2,5 \times 10^5$ células de levedura de *C. neoformans* (Multiplicidade de infecção; MOI = 5) foram adicionadas a cada poço contendo 100 μ L de meio RPMI suplementado com FBS a 10% e anticorpo 18B7 (gentilmente doado pelo Dr. Arturo Casadevall, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, EUA) na concentração de 10 μ g / mL. As co-culturas de cepas de *C. neoformans* com macrófagos foram então incubadas por 2 ou 24 h pós-infecção (hpi) a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Após 2 h de interação, as células de levedura não internalizadas foram removidas por lavagem dos poços com PBS. Para os ensaios de 24 h, meio RPMI pré-aquecido fresco com 10% de FBS foi adicionado para os poços.

Para a quantificação da fagocitose, as células foram fixadas e coradas com *Fast Panoptic kit* (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). Sob o microscópio Axio Observer Primovert GmbH (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany), 200 macrófagos por poço foram observados para a determinação da porcentagem de fagocitose (porcentagem de macrófagos fagocitaram uma ou mais leveduras em relação ao número total de células contadas) e o índice fagocítico (o número médio de células de levedura fagocitadas por BMDM).

Para determinar a capacidade das cepas de *C. neoformans* de proliferar dentro de BMDMs, os ensaios de unidades formadoras de colônias (UFC) foram realizados após 2 ou 24 horas de co-cultura. Depois dos períodos de incubação, as células de levedura foram liberadas por lise dos macrófagos com SDS a 0,05% (Dodecilsulfato de sódio). Para o ensaio de 24 h, o sobrenadante e o lisado foram combinados. O número de UFCs foi determinado por diluição em série, de cada amostra semeada, em ágar YPD incubado a 30 °C e contado após 48 h. A atividade fagocítica, definida como o número de UFC

obtidas de um poço no ponto de tempo de duas horas, e o crescimento intracelular, definido como o número de UFCs do ponto de tempo de 24 h, foram determinados.

Três experimentos independentes foram realizados em triplicado técnica. As comparações de grupo foram conduzidas por análise de variância unilateral (ANOVA) seguida por Pós-teste de *Dunnnett*. Para a comparação de proporções, foi realizado o teste Qui-quadrado com um valor de $p < 0,05$.

Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com as normas nacionais e institucionais de cuidado animal e foram aprovados pela Universidade de Brasília (UnB) Comitê de Ética no Uso de Animais (Proc. UnB Doc 52657/2011).

4.11. Teste de virulência em *Galleria mellonella*

A infecção por mellonella foi realizada conforme descrito anteriormente por García-Rodas et al. (García-Rodas et al. 2011b). Resumidamente, 16 larvas de *G. mellonella* coletadas aleatoriamente foram inoculadas com 10 μ L de uma levedura 10^6 suspensão de células / mL por injeção na última pró-pata esquerda usando uma agulha estéril de calibre 26 (Seringa de Hamilton). Larvas de *G. mellonella* foram inoculadas com 1 \times PBS como controle da lesão física durante a inoculação. A lagartas foram incubadas em estufa 30 °C. A sobrevivência larval foi avaliada diariamente durante 7 dias. A morte larval foi definida pelo ausência de movimento em resposta ao toque.

4.12. Ensaio de susceptibilidade à drogas genotóxicas

As leveduras foram crescidas em YPD pH 5,6 por 24 h, lavadas com PBS e contadas para ajuste de densidade celular. Um total de 5×10^6 cél/mL foi aplicado em falcons de 15 ml contendo YPD acrescido de drogas genotóxicas, a saber 0,01 e 0,02% MMS; 0,01 e 0,02 % EMS; 5, 10 e 20 mM MX para análise do crescimento fúngico. As células foram lavadas em PBS e crescidas em placas com YPD e incubadas em estufa a 30 °C e analisada após 48 h de crescimento para contagem de cfu. Para análise de sensibilidade dose dependente, as leveduras foram diluídas serialmente em PBS nas concentrações de 10^5 a 10^2 células por 5 μ L e pipetadas em placas contendo meio YPD ágar acrescido de drogas em concentrações de 0,03%, 0,06% e 0,12% de MMS; 0,03%, 0,04%, 0,06% e 0,12% de EMS; 32,5, 65, e 120 μ M de CdSO₄; 200 μ g/mL de N-ethyl-N-nitrosurea (ENU), 20 μ g/mL brometo de etídeo (etBr) ou 110 mM Hidroxiurea (HU). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C, protegidas da luz por 48 h e o perfil de crescimento foi avaliado. Foram consideradas significativas as diferenças de crescimento

de, pelo menos, uma diluição. Os fenótipos foram comparados com a linhagem parental em cada condição de tratamento, bem como em relação ao perfil de crescimento de cada linhagem em relação ao seu próprio crescimento meio sem estressores.

Para a análise de susceptibilidade à radiação UV, diluições em série de suspensões de células foram dispostas em placas de YPD ágar e exposto a irradiação UV nas energias de 0 J/m², 120 J/m², 240 J/m², 300 J/m² e 480 J/m² em câmara UV UVP CX-2000 (Fisher Scientific, Leicestershire, UK). As placas foram incubadas a 30 °C por 2 dias e fotodocumentadas. Para análises de viabilidade, 5 × 10² células foram lavadas, semeadas em placas YPD e expostas a 120, 240 ou 480 J / m² em 254 nm em câmara de UV. As placas foram protegidas da luz e incubadas em 30 °C por 2 dias para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). As células de levedura foram colocadas em YPD ágar contendo os agentes indutores de estresse de danos ao DNA: HU (110 mM), MMS (0,03%), EMS (0,04%), N-etil-N-nitrosourea (ENU) (200 µg/mL), solução de Brometo de Etídio (EtBr) (20 µg/mL).

Para análises de viabilidade celular, as leveduras foram inoculadas em YPD líquido contendo MMS (0,1% ou 0,2%), EMS (0,1% ou 0,2%), metoxi-amina (MX) (0,417 mg / mL a 1,67 mg / mL), ou Zeocina (0,4% a 0,16%) e incubado por 1 h, a 30 ou 37 °C, a 200 rpm. Quinhentas células foram lavados, semeados em placas YPD e incubados a 30 °C por 2 dias para contagem de CFU. O ensaio foi realizado como três experimentos independentes. Teste estatístico unilateral ANOVA com o pós-teste de Dunnett foi aplicada, para comparar os resultados.

Para a avaliação da fragmentação de DNA, 5 × 10⁷ células das cepas de *C. neoformans* foram expostos a 0,08% de zeocina por 1 h em meio líquido YPD a 30 °C a 200 rpm. Células foram lavados com PBS e o DNA foi extraído usando o protocolo Smash and Grab. Um µg de DNA genômico foi aplicado em gel de agarose 1,5% corado com 0,5 µg / mL de EtBr. O DNA genômico da cepa H99 não exposta foi usado como controle negativo de fragmentação. O padrão de migração de DNA em gel de agarose foi comparado ao DNA genômico de H99 não exposto para definir a presença de “rastro”, característico de fragmentação de DNA. O ensaio foi realizado em três experimentos independentes.

Para a avaliação da ação combinada de MX e H₂O₂, 1 × 10⁶ células / mL foram cultivadas em meio YPD contendo 0,417 mg / mL de MX combinado com 3 mM ou 5 mM H₂O₂, por 1 h, a 30 °C e 150 rpm. Células cultivadas em YPD contendo apenas 1

mM ou 5 mM H₂O₂ foram usadas como controle. A viabilidade celular foi avaliada por contagem de UFC. Os resultados foram representados em gráficos como a proporção de células expostas a MX + H₂O₂ normalizadas para as células expostas a H₂O₂. Para a análise de sobrevivência, as células das cepas WT e mutantes foram incubado em meio YPD líquido por 1 h, a 30 °C e 150 rpm na ausência (controle) ou na presença de MX (0, 0,417, 0,834 ou 1,67 mg / mL). As células foram então lavadas com PBS e o número de UFCs foi avaliado. Para a análise de fatores de virulência após exposição à MX, as células de cada cepa foram incubadas com 0,417 mg / mL MX por 1 h, a 37 °C. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS, diluídas e aplicadas em placas contendo os meios de cultura indutores específicos para análises de produção de melanina e atividade de urease. A detecção visual foi realizada diariamente e documentada após 72, 96 e 144 h de crescimento. O ensaio foi realizado em triplicata experimental.

4.13. Ensaio de susceptibilidade à antibióticos

Uma solução estoque de cada agente antifúngico foi preparada conforme recomendado pelo protocolo NCCLS M27-A3. As seguintes drogas e intervalos de concentrações testados foram: Anfotericina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 0,125 a 16 µg / mL; Fluconazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 0,008 a 64 µg / mL. A droga Metoxiamina foi testada na faixa de concentração de 0,125 a 16 mg / mL. Cem µL de cada agente químico, diluído em meio RMPI, a uma concentração de duas vezes, foi colocado em poços duplicados de placas estéreis de 96 poços (Corning Glass Works, Corning, NY, EUA). Uma alíquota de 5×10^4 células de levedura / mL em meio RPMI foi adicionada aos poços contendo as drogas. As placas foram então incubadas a 37 °C, protegidas da luz. Pontos finais foram verificados macroscopicamente após 72 h. CIM (concentração inibitória mínima) foi definido como a concentração mais baixa na qual houve uma inibição visualmente completa de crescimento, em comparação com os controles. O ensaio foi realizado como três experimentos independentes

Ensaio de interação checkerboard

A interação da Anfotericina B (AmpB) com o Cloridrato de Metoxiamina (MX) foi avaliada pelo método *checkerboard* da microdiluição empregando as cepas H99, *apn1Δ*, *apn2Δ* e *apn1Δapn2Δ* (Schwarz et al. 2007). As concentrações da droga variaram de diluições cinco vezes abaixo a quatro vezes acima da MIC estimada. Cinquenta µL de cada droga, AmpB e MX, em uma concentração de duas vezes em meio RPMI foram adicionados a placas de 96 poços.

Todas as cepas foram cultivadas em meio YPD e incubadas por 20 h a 30 ° C sob agitação. As células foram lavadas com PBS 1 × e a concentração do inoculo foi ajustada para 1×10^5 células mL⁻¹. Cem µL desta solução foram adicionados aos poços contendo 50 µL de ambas as drogas na concentração de 2 ×. Controles positivos sem drogas e controles negativos sem células de levedura foram realizados. As placas foram protegidas da luz e incubadas a 37 °C. Após 72 h de incubação, as culturas do ponto final foram lidas visualmente. Os testes foram realizados em duas repetições biológicas.

A proliferação celular foi avaliada e o índice de concentração inibitória fracionária (FICI) foi calculado conforme descrito anteriormente por Pfaller et al., (2015) (Pfaller et al. 2015). O FICI foi calculado pela equação: $FICI = (MICa \text{ em combinação} / MICa \text{ testado sozinho}) + (MICb \text{ em combinação} / MICb \text{ testado sozinho})$; MICa: AmpB e MICb: MX. O resultado do FICI foi interpretado da seguinte forma: $\leq 0,5$ -sinergia, $> 0,5$ e $\leq 4,0$ -indiferente, $> 4,0$ -antagonismo (Pfaller et al. 2015).

4.14. Análises estatísticas

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP), a menos que seja indicado de outra forma. A análise estatística foi realizada por meio do software GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA, www.graphpad.com, acessado em 11 de fevereiro de 2021). O teste apropriado é indicado para cada experimento. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Capítulo I

Enzimas Ap-endonucleases modulam a resposta ao dano no DNA e virulência de *Cryptococcus neoformans*.

O reparo de DNA desempenha papel importante na manutenção da estabilidade dinâmica do genoma dos organismos, em especial de organismos patogênicos, os quais necessitam de uma ampla capacidade de adaptação às condições distintas e instáveis do ambiente do hospedeiro (Shiloh and Lehmann 2004). O conhecimento acerca das enzimas de reparo de DNA de *C. neoformans*, e da participação dessas proteínas na dinâmica de sobrevivência e patogenicidade do microorganismo, apesar de relevante e promissor, ainda é novo e carece de estudos. Diante disso, com o objetivo de avaliar o papel da via BER de reparo de DNA na biologia de *C. neoformans*, foram selecionados e caracterizados os genes *APN1* e *APN2*, considerados chave para a atividade dessa via em *C. neoformans*. Além do estudo individualizado dos genes, foi analisado também o impacto da ausência desses genes na produção de fatores de virulência e resistência a drogas pelo fungo.

Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados no artigo científico intitulado “**Base Excision Repair AP-Endonucleases-Like Genes Modulate DNA Damage Response and Virulence of the Human Pathogen *Cryptococcus neoformans***” Rayssa K. M. Oliveira¹, Fabián A. Hurtado¹, Pedro Henrique Gomes, Luiza Lassi Puglia, Fernanda Fonseca, Kunal Hajan², , Patrícia Albuquerque², Marcio Poças¹, Ildinete Silva-Pereira¹ * and Larissa Fernandes² * publicado no periódico *Journal of Fungi*, na data de 12 de fevereiro de 2021 (**Anexo 1**).

5. Resultados

5.1.A proteína hipotética Apn2 de *C. neoformans* pertence à família das AP-endonucleases Xth e possui domínios multifuncionais.

Os genes de reparo pré-selecionados para *knockout* (KO) foram *APN1* e *APN2*, escolhidos com base na literatura existente para os sistemas de reparo de DNA descritos para *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Schizosacharomyces pombe* e *Homo sapiens*. Após a escolha dos genes alvo deste estudo, foram feitos alinhamentos para identificação das sequências correspondentes aos genes no genoma de *Cryptococcus neoformans var. grubii* (H99).

Os alinhamentos de sequência foram realizados empregando banco de dados do NCBI, disponível em: www.blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov, e o banco de dados do BROAD institute, disponível em: http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans/MultiHome.html. As análises foram feitas usando como “*query*” (sequência de entrada) as sequências de nucleotídeos e aminoácidos dos genes e proteínas de *S. cerevisiae*. Para busca no BLAST/NCBI, foram selecionados o genoma de *C. neoformans spp.*, *C. neoformans var. grubii* (H99), *S. cerevisiae*, e genomas gerais disponíveis nos bancos de dados.

Inicialmente, foi selecionada a sequência da proteína ScApn1 de *S. cerevisiae* (NCBI ID 853746), no formato FASTA, como *query* para os primeiros alinhamentos. O resultado do alinhamento apresentou uma sequência com 46% de identidade localizada no cromossomo 14 de H99. Usando a ferramenta de pesquisa interna BLAST no banco de dados BROAD, obteve-se a proteína AP-endonuclease 1 (CNAG_05468) de *C. neoformans* H99 (cromossomo 14), como resultado. A proteína predita CnApn1 apresenta dois domínios de atividade: domínio xilose isomerase-like (posição 138), e um domínio nfo-apurínico endonucleases (*endonucleases IV-like protein*; posição 428). A proteína CnApn1 compartilha 48,3% de identidade com a Apn1 de *S. pombe*, 45,8% com a endonuclease IV de *E. coli*, 43,9% com a Apn1 de *C. albicans* e 42,4% de identidade com a proteína Apn1 de *S. cerevisiae*.

Para identificação da sequência da Apn2 de *C. neoformans*, foi realizada uma pesquisa interna no site do BROAD usando a sequência da proteína ScApn2 de *S. cerevisiae* (NCBI ID 852262). A busca resultou na identificação da proteína

Exodesoxiribonuclease III (CNAG_04268). A proteína codificada pela sequência CNAG_04268, denominada Apn2, apresenta outros domínios, além do responsável pela atividade endonucleásica, como *endonuclease reverse transcriptase*, *exo DNase* e *zinc finger*.

Para a comparação estrutural entre as sequências de Apn2 de diferentes organismos, a sequência de aminoácidos codificada pela CNAG_04268 foi usada como query para análises usando a ferramenta BLASTp/NCBI contra os genomas de *S. pombe*, *H. sapiens*, *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *E. coli*. Conforme apresentado na **Figura 6**, a proteína Apn1 predita de *C. neoformans* compartilha resíduos de aminoácidos conservados com as proteínas Apn2 de *S. pombe*, APE2 humana e Apn2 de *S. cerevisiae*. Entre as proteínas de *C. neoformans*, apesar de compartilharem domínios de atividade endonucleásicas, as proteínas Apn1 e Apn2 de *C. neoformans* compartilham apenas 22,51% de identidade, e apresentam estrutura de aminoácidos distinta. A proteína Apn1 possui 483 resíduos de aminoácidos, enquanto a proteína predita Apn2 totaliza 719 resíduos de aminoácidos.

A região N-terminal da proteína predita CnApn2 apresenta um domínio pertencente a superfamília EEP (*Exonuclease-Endonuclease-Phosphatase*, *EEP*) que é conservado em todas as espécies de fungos analisadas neste estudo. Diversas proteínas possuem domínios pertencentes à superfamília EEP, entre elas a família ExoIII AP-endonucleases (Eisen and Hanawalt 1999). Diferente dos demais organismos analisados, a sequência CnApn2 apresenta um domínio *Atrophin-1*. Proteínas atrofinas são descritas como co-repressoras transcricionais e participam de mecanismos envolvendo sinalização celular a partir de receptores nucleares (L. Wang and Tsai 2008). O domínio atrophin-1 possui 250 aminoácidos, que estão ausentes na proteína CnApn1 (**Figura 6**).

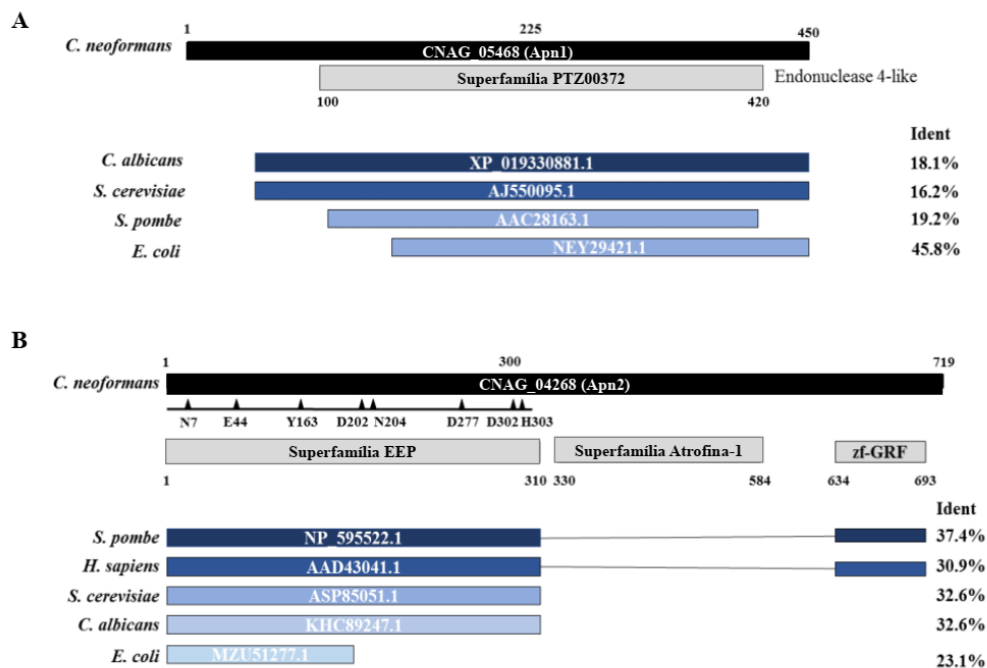


Figura 6 Análise comparativa de sequências previstas de aminoácidos das proteínas Apurínica/apirimidínica endonucleases (Apns). As sequências de nucleotídeos dos genes *APN1* (CNAG_05468) e *APN2* (CNAG_04268) de *C. neoformans* foram utilizadas para análises por Blastp. **A)** Resultados de alinhamento de sequências deduzidas de aminoácidos das proteínas Apn1 de *C. albicans*, *S. pombe*, *S. cerevisiae* e *E. coli*, destacando a cobertura e identidade com a sequência prevista de aminoácidos da Apn1 de *C. neoformans*. **B)** Resultados de alinhamento de sequências de Apn2 de *S. pombe*, *H. sapiens*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* e *E. coli*, destacando a cobertura e a identidade com a sequência prevista de aminoácidos da Apn2 de *C. neoformans*. Os números de acesso no banco NCBI são descritos em cada representação da proteína. Os triângulos representam os aminoácidos-chave para os sítios catalíticos; Ident: porcentagem de identidade de aminoácidos fornecida pela análise Blastp no NCBI. EEP: exonuclease-endonuclease-fosfatase. zf-GRF: domínio de dedo de zinco.

A Apn1 de *C. neoformans* possui um domínio nfo (domínio da família Exonuclease IV) e é consistentemente diferente da proteína Apn2. A Apn2 de *C. neoformans* é da família Xth de endonucleases e possui domínios característicos de proteínas que desempenham papéis no processo transcricional. A presença dos domínios Atrofin-1 e zf-GRF consolidam a estrutura proteica envolvida em atividades transcricionais, como ligação ao DNA e ligação proteína-proteína (L. Wang and Tsai 2008; BD et al. 2017). Entre os organismos analisados nesse estudo, apenas a Apn2 de *C. neoformans*, *S. pombe* e *H. sapiens* possuem o domínio zf-GRF. A ausência desse domínio na proteína CnApn1

e nas proteínas Apn2 de outros fungos sugere que proteínas Apn desempenham papéis diferentes no reparo de DNA e nas respostas celulares entre os diferentes fungos.

Análises *in silico* revelaram a semelhança entre CnApn2, SpApn2 e HsAPE1 / APE2, revelando a proximidade das proteínas BER de *C. neoformans* e *S. pombe* às proteínas humanas, mais do que a outras proteínas de levedura. É interessante notar que embora as enzimas para a remoção de sítios AP, bem como muitas das N-glicosilases de DNA, sejam conservadas entre procariotos e eucariotos, tal conservação não existe entre os componentes de outras vias de reparo de DNA (Krokan and Bjørås 2013c; Spivak 2016; Eisen and Hanawalt 1999). A identificação de Apn2 e a demonstração de seu envolvimento no reparo de sítios de AP em leveduras atesta o alto grau de conservação das vias para reparar sítios AP.

5.2.A proteína Apn2 predita de *C. neoformans* apresenta domínios proteicos associados à atividade de fator de transcrição.

A proteína Apn2 de *C. neoformans* já foi descrita como um fator de transcrição (Jung et al., 2015). Esse dado foi obtido com base na análise de sequências de aminoácidos e pela presença de domínios conhecidamente relacionados com interação proteína-proteína e proteína-DNA na Apn2 de fungos. Apesar da relevância do *C. neoformans* para a saúde mundial, as ferramentas de análise e predição de estruturas e atividades *in silico* para este organismo ainda permanecem escassas. Diante disso, o estudo da predição de atividade das proteínas deste fungo ficam limitadas à análise comparativa com os resultados obtidos para outros fungos, especialmente com *S. cerevisiae*, cujos dados estão melhor descritos na literatura. Neste estudo, foi realizada a análise das interações da proteína Apn2 de *S. cerevisiae*, organismo vastamente estudado, para comparação e predição de atividade e regulação da proteína Apn2 de *C. neoformans*.

Analisando as anotações contidas no sítio *yeastract* (<http://www.yeastract.com/promanalysis.php>), as quais levam em considerações resultados confirmados experimentalmente (interação referenciada) e/ou predições de atividade baseadas em domínios de ligação da sequência, sem comprovação experimental disponível (Interações potenciais), é possível observar a interação de Apn2 com importantes fatores de transcrição de *S. cerevisiae*. A proteína Apn2 de *S. cerevisiae* foi usada como entrada para busca de fatores de transcrição no domínio Yeaststract e os

resultados são apresentados na **Tabela 2**. Os autores Workman e colaboradores (2006) documentaram a associação de Apn2 de *S. cerevisiae* com os fatores de transcrição Ino4, importante na expressão de genes responsivos às cascatas de sinalização por inositol, e Swi5p (Di Talia et al. 2009), requerido na transcrição mediada por THFII e na transição G1/S (**Tabela 2**) (Workman et al. 2006). Segundo a análise executada no domínio, dentre os genes envolvidos na regulação de Apn2 de *S. cerevisiae* estão descritos Yap-1 e Xbp-1, ambos fatores de transcrição comprovadamente importantes para a virulência e resistência a drogas em *C. neoformans* (Paul, Doering, and Moye-Rowley 2015a; Upadhyaya et al. 2013a; Rodrigues-Pousada, Menezes, and Pimentel 2010)

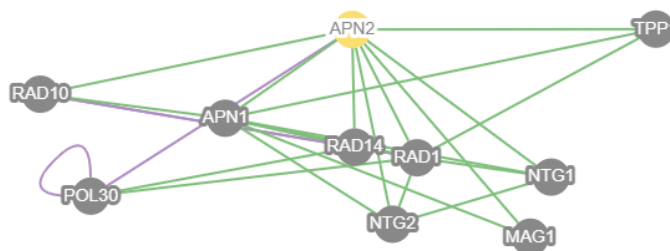
Tabela 2. Descrição da análise de fatores envolvidos na regulação transcricional de Apn2(YBL019W) de *S. cerevisiae*, gerada pela análise no domínio <http://www.yeasttract.com/>.

| FT | Interação Referenciada | Relação |
|--|--|---------------|
| Cst6p | Chua G et al., PNAS, 2006;103(32):12045-50 | Positiva |
| Ino4 | Workman CT et al., Science, 2006;312(5776):1054-59 | Não-aplicável |
| Mga1p - | Reimand J et al., Nucleic Acids Res, 2010;38(14):4768-77 | Positiva |
| Bas1p | Fendt SM et al., Mol Syst Biol, 2010;6(0):432 | Negativa |
| Swi5p | Di Talia et al, PLOS Biol, ;2007(10):e1000221 | Negativa |
| Ash1p - | Di Talia et al, PLOS Biol, ;7(10):e100022 | Positiva |
| Ace2p - | Di Talia et al, PLOS Biol, ;7(10):e1000221 | Negativa |
| Sfp1p - | Chua G et al., PNAS, 2006;103(32):12045-50 | Positiva |
| Abf1p - | Schlecht et al., Mol Biol Cell, ;19(5):2193-2207 | Não-aplicável |
| Tec1p | Madhani HD et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1999;96(22):12530-5 | Positiva |
| Ste12p | Madhani HD et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1999;96(22):12530-5 | Negativa |
| Interações Potenciais. FT – Região – Sequência de ligação | | |
| Ash1p - Promoter - YTGAT | Mcm1p - Promoter - DCCYWWNNRG | |
| Azf1p - Promoter - AAGAAAAA | Mot3p - Promoter - AAGGWT | |
| Cup2p - Promoter - HTHNNGCTGD | Mot3p - Promoter - ATGGAT | |

| | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| Fkh1p - Promoter - RYMAAYA | Mot3p - Promoter - AAGAGG |
| Fkh1p - Promoter - RYAAACAWW | Mot3p - Promoter - AAGGKA |
| Fkh1p - Promoter - RTAAAYAA | Ndt80p - Promoter - GNCRCAA AW |
| Fkh2p - Promoter - RTAAAYAA | Nrg1p - Promoter - CCCTC |
| Fkh2p - Promoter - RYMAAYA | Rtg1p - Promoter - GTTAC |
| Fkh2p - Promoter - RYAAACAWW | Rtg1p - Promoter - GTCAC |
| Gat1p - Promoter - GATAAG | Rtg3p - Promoter - GTTAC |
| Gcr1p - Promoter - CTTCC | Rtg3p - Promoter - GTCAC |
| Gcr1p - Promoter - CWTCC | Stb5p - Promoter - CGGNS |
| Gln3p - Promoter - GATAAG | Ste12p - Promoter - TGAAACA |
| Gzf3p - Promoter - GATAAG | Sum1p - Promoter - GNCRCAA AW |
| Hac1p - Promoter - CCAGC | Tec1p - Promoter - RMATTCYY |
| Hsf1p - Promoter - NTTCNNGAAN | Xbp1p - Promoter - CTCGA |
| Mcm1p - Promoter - CCYWWWNNRG | Yap1p - Promoter - TTA CTCA |

Utilizando as ferramentas de avaliação e predição de interações proteicas contidas no domínio yeastgenome, foi possível gerar a rede de possíveis interações proteicas realizadas pela proteína Apn2 em *S. cerevisiae* (<https://www.yeastgenome.org/locus/S000000115/interaction>). O domínio yeastgenome é um banco de dados, de domínio público, que permite a análise de diferentes características de grande número de genes e proteínas, bem como prever interações realizadas entre proteínas de *S. cerevisiae*. Avaliando especificamente a proteína Apn2, observa-se que a proteína pode realizar interação física com a proteína polimerase 30 (Burkovics et al. 2006). São consideradas interações físicas aquelas evidenciadas em ensaios de imunoprecipitação de conjugados proteicos, em que a imunoprecipitação de uma proteína revela a presença de outras à ela ligadas. Para o banco de dados, as interações genéticas são as associações a nível de expressão genica, com modulação positiva ou negativa de genes em resposta à proteína analisada. Os resultados

demonstraram a interação genética de APN2 com diversas outras proteínas, envolvidas principalmente no reparo de DNA, como RAD1 e RAD10 (Figura 7).



Current Locus Other Locus

SGD 2021-05-20

Figura 7 Interações físicas e genéticas realizadas pela proteína Apn2 de *S. cerevisiae*. Em roxo interação física entre as proteínas; em verde, interações genéticas. Figura gerada pelo site yeastgenome, disponível em (<https://www.yeastgenome.org/locus/S000000115/interaction>).

A manutenção dos domínios catalíticos já é descrita para diferentes organismos na literatura, o que decorre da grande importância dos sistemas de reparo de DNA para a sobrevivência celular (Eisen and Hanawalt 1999). Como as proteínas precisam manter a atividade AP-endonucleásica funcionando com eficiência, a seleção natural tende a resultar em conservação de sítios de atividade ao longo das gerações. Grandes modificações nos resíduos de aminoácidos dos domínios ativos podem resultar em comprometimento da atividade final, culminando na seleção negativa do indivíduo (Magditch, Liu, Xue, and Idnurm 2012; Nakamura et al. 2004). A sequência de aminoácidos da proteína Apn2 predita de *C. neoformans* apresenta características *in silico*, como posição estrutural de sítios catalíticos e dobramento proteico, bastante semelhantes às proteínas de organismos mais complexos como mamíferos.

5.3. A proteína Apn2 de *C. neoformans* possui um cluster de cisteínas em posição semelhante ao cluster redox-ativo da APE1 humana

Apesar de a proteína Apn2 de *C. neoformans* ter sido listada como um fator de transcrição (Jung et al. 2015c), não foram feitas análises experimentais visando estabelecer sua atividade de reparo ou a possível associação entre seus domínios e atividades de reparo de DNA ou ativação transcricional. Uma das hipóteses propostas neste trabalho é que a proteína Apn2, tal como a APE1 humana (Evans, Limp-Foster, and

Kelley 2000), possa agir na regulação transcricional por dois principais mecanismos: atuando como trans-ativador e/ou como ativador responsivo à situação de redox celular. A APE1 humana apresenta atividade de ativação redox sensível de fatores de transcrição((Jedinak et al. 2011; Wilson and Barsky 2001; Evans, Limp-Foster, and Kelley 2000)). Essa atividade é realizada através da redução e oxidação das cisteínas, em especial a C65 e C93, situadas no domínio ativo (Luo et al. 2010). Os resíduos de cisteína envolvidos na atividade redox de APE1 humana estão organizados em uma das duas folhas beta que formam a estrutura “beta sanduiche” da proteína (Luo et al. 2012). Para avaliar essa proposta foram feitas análises *in silico* do dobramento e posicionamento de resíduos de cisteína nas proteínas Apn2 de *C. neoformans* (**Figura 8**).

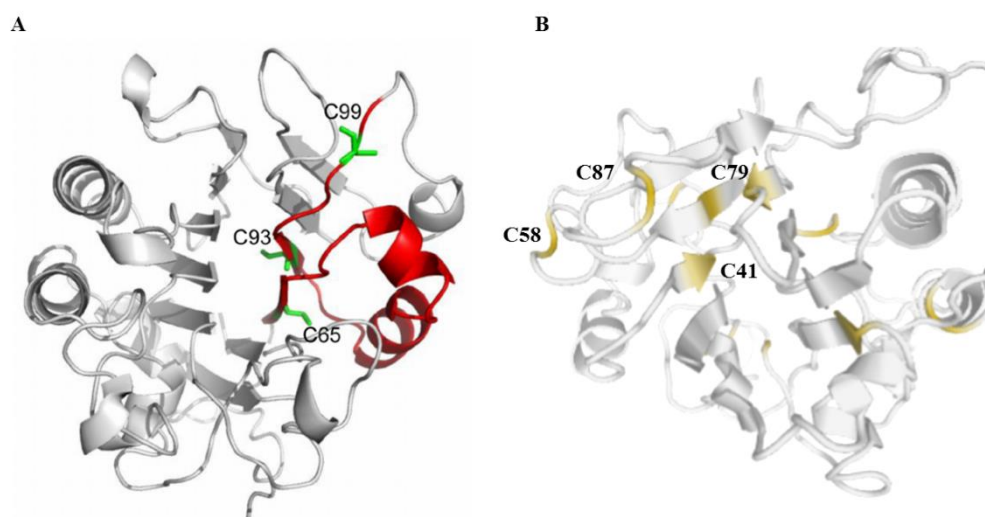


Figura 8. A proteína predita Apn2 de *C. neoformans* possui um cluster de cisteínas semelhante ao observado na proteína APE1 humana. **A)** proteína APE1 humana. Em vermelho a região do cluster de cisteínas envolvido na atividade de ativação redox transcricional (retirada de (Luo et al. 2012); **B)** Proteína Apn2 de *C. neoformans* modelada neste trabalho usando o *software online swiss-model* (sequência de aminoácidos da proteína APE1 usada como molde (33,99% identidade). Regiões destacadas em amarelo representam a localização das cisteínas que são chaves para a possível função redox dessa proteína fúngica (função ainda sem evidência experimental).

As cisteínas C65 e C93 estão localizadas na fita adjacente localizada em uma das folhas-beta, voltada para o centro da proteína, enquanto a C99 localiza-se em um loop, no lado oposto (**Figura 8A**). A atividade redox da proteína APE1 humana não foi descrita em proteínas AP-endonucleases fúngicas. Quando analisada a estrutura terciária da Apn2 de *C. neoformans*, modelada pelo software *Swiss-PROT* a partir da proteína APE1 humana listada como molde (33,99% de identidade), observa-se a presença de várias

cisteínas, dispostas em regiões mais externas à proteína. Três das cisteínas presentes na Apn2 de *C. neoformans* localizam-se na região sobreposta àquela predita como sendo o cluster de atividade redox da APE1 humana, são elas C79 e C41, localizadas na folha-beta voltadas ao centro da proteína, e a C87 localizada no loop, em lado oposto (**Figura 8B**). As Apns de *S. cerevisiae* e *C. albicans* não apresentam similaridade conformacional com a APE1 humana, nem dispõem de cisteínas em regiões próximas ao cluster de atividade (em dobramentos usando APE1 como molde). Esse modelo é bastante interessante pois reforça a proposta de que a proteína Apn2 de *C. neoformans* poderia apresentar atividade redox, o que nunca antes foi observado para AP-endonucleases em fungos.

A Apn2 de *C. neoformans*, apresentou cisteínas posicionadas exatamente sobrepostas às cisteínas com função de controle redox da proteína APE1 humana, função esta que confere a multifuncionalidade e complexidade da proteína APE1 humana (**Figura 8**). A proteína APE1 possui diversas atividades importantes para a célula além do reparo de DNA e por isso está sujeita a regulações em diversos níveis (M. Li and Wilson 2014a; Evans, Limp-Foster, and Kelley 2000). Além de guardar similaridades na sequência, a conformação estrutural da proteína Apn2 de *C. neoformans* contribui para a hipótese de que, no fungo, a proteína também seja altamente regulada, uma vez que os dobramentos calculados para a proteína do fungo orientam os resíduos de aminoácidos para a camada mais externa após enovelamento, expostos a possíveis modificações pós-traducionais. A conformação das cisteínas é mantida mesmo quando usadas outras proteínas como moldes para cálculo da estrutura 3D. Além disso, o gene *APN2* de *C. neoformans* apresenta regulação à nível transcricional em respostas associadas à virulência (Tabela 4).

Experimentos completos de interação e regulação transcricional são indispensáveis para identificar os mecanismos moleculares utilizados por Apn2 de *C. neoformans* para o controle redox celular. Contudo, o avanço da tecnologia e a maior capacidade de predição de estruturas e atividades proteicas a partir de softwares sugerem que as semelhanças estruturais, de sequência e dobramento, entre a proteína Apn2 de *C. neoformans* e a APE1 humana, ao menos direcionam o entendimento para uma maior complexidade da proteína de *C. neoformans* quando comparada a outros fungos, ainda que a presença das estruturas seja apenas um indicativo evolutivo para possíveis ganhos de funcionalidade.

A proteína Apn2 de *C. neoformans* foi previamente sugerida como um fator de transcrição (Jung et al. 2015a). Jung et al. (2015) avaliaram a presença de sequências de DNA associadas à atividade transcricional em banco de dados do genoma de *C. neoformans*, detectaram que o mutante nulo CNAG_04268 tinha um defeito de crescimento a 39 °C e caracterizaram o papel potencial desse gene como fator de transcrição (Jung et al. 2015a). No entanto, os autores não discutiram a homologia da proteína deduzida CNAG_04268 com componentes de reparo de DNA, nem avaliaram o efeito da deleção combinada de Apn1 e Apn2 no contexto de resposta a danos ao DNA e sobrevivência de *C. neoformans*.

5.4. Geração e confirmação de mutantes da via BER

Para avaliar o impacto direto das atividades de reparo de DNA sobre os processos celulares de *C. neoformans*, foram geradas linhagens fúngicas mutantes, nas quais os genes *APN1*, *APN2* e *XPC* foram deletados do genoma. A deleção dos *loci* de interesse foi realizada segundo técnica descrita por (M. S. Kim et al. 2009) e confirmada através de PCR e Southern Blot conforme descrito em Material e Métodos. Os dados relacionados à deleção de *XPC* serão apresentados no capítulo II.

A confirmação dos mutantes *apn1*Δ, *apn2*Δ, *apn1*Δ*apn2*Δ e reconstituídos foi realizada por PCR usando oligonucleotídeos desenhados para regiões internas do gene de interesse, na junção dos cassetes de reconstituição no genoma e os resultados estão apresentados na **Figura 9**. Os organismos mutantes confirmados foram estocados a -80 °C e submetidos às análises subsequentes. O resultado da confirmação de mutantes de Apn1 por Southern blot após análise do perfil de restrição pode ser observado na **Figura 10**.

Os mutantes *apn2Δ*, *apn1Δapn2Δ* e reconstituídos foram confirmados apenas por PCR.

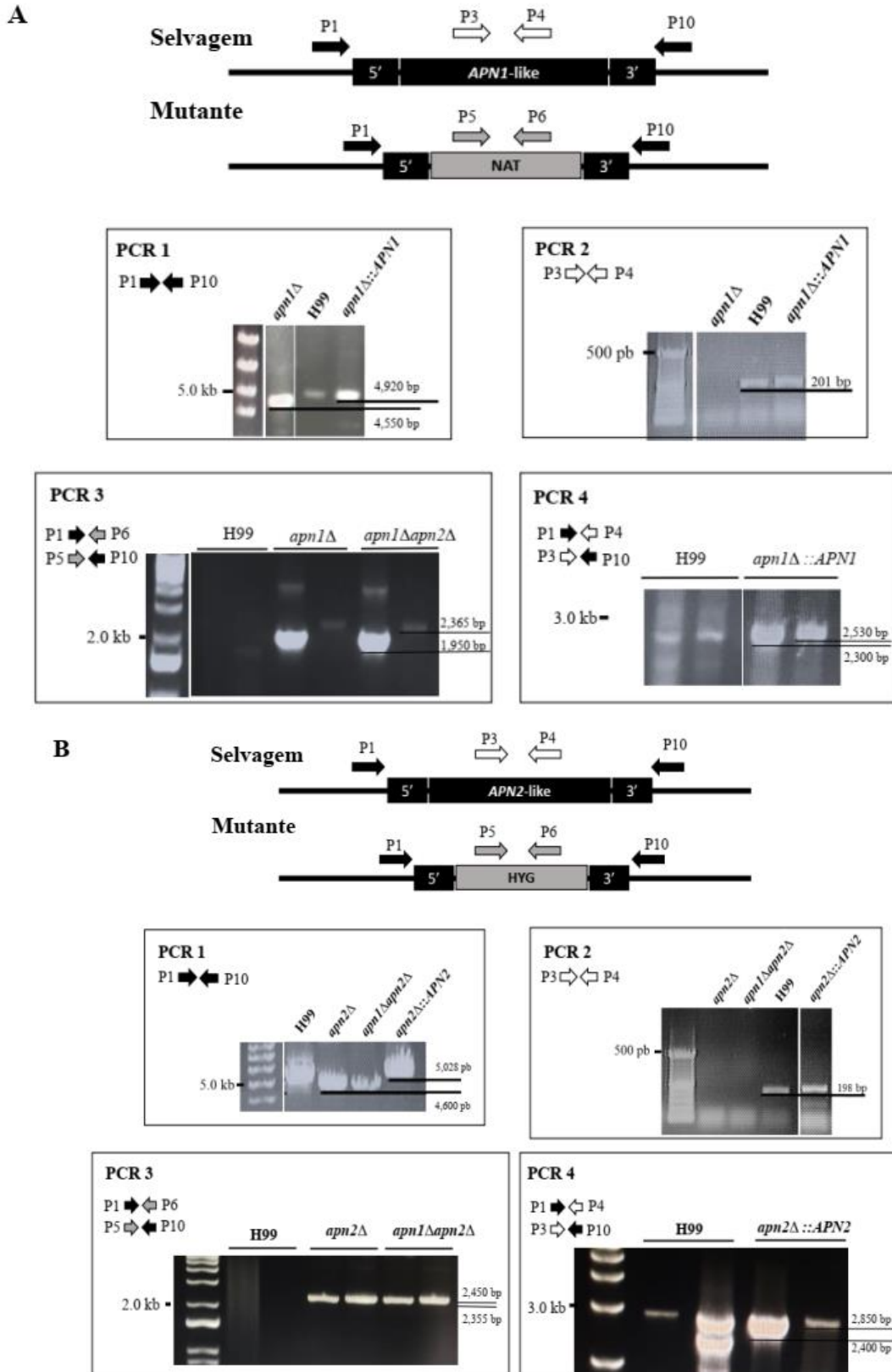


Figura 9. Confirmação de mutantes por PCR. Confirmação por PCR da deleção de genes alvo em cepas mutantes. Representação esquemática de quatro conjuntos de PCR para confirmação da interrupção dos genes *APN1* e *APN2*. A PCR 1 foi realizada com iniciadores projetados fora da região flanqueadora na porção 5' do gene, e região de flanqueamento 3' (setas pretas). Os mutantes confirmados geraram um único fragmento em PCR1 que diferia em tamanho daquele do WT e das cepas reconstituídas específicas. A PCR 2 consistiu em reações usando iniciadores específicos para o gene alvo (setas brancas). Esperava-se que o gene alvo fosse amplificado a partir do gDNA WT, ao passo que nenhum amplicon fosse gerado a partir do DNA dos mutantes confirmados. PCR3 foi realizada com iniciadores projetados para as regiões 5' e 3' externas (setas pretas) e para o marcador de resistência a antibióticos (HYG: Hígromicina B; NAT: Nourseotricina; setas cinza). Esperava-se que os amplicons na PCR 3 fossem gerados apenas a partir do DNA dos mutantes confirmado. A PCR 4 foi realizada usando uma combinação de iniciadores para a região flanqueadora e específicos para o gene alvo (setas brancas). No PCR 4, esperava-se que os genes-alvo fossem amplificados apenas a partir do DNA das cepas reconstituídas. **A)** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com 0,5 µg / mL de EtBr do DNA referente ao gene *APN1* e amplicons das cepas reconstituídas. **B)** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com 0,5 µg / mL de EtBr do DNA referente ao gene *APN2* e amplicons das cepas reconstituídas. O tamanho dos amplicons é indicado em pares de bases (bp).

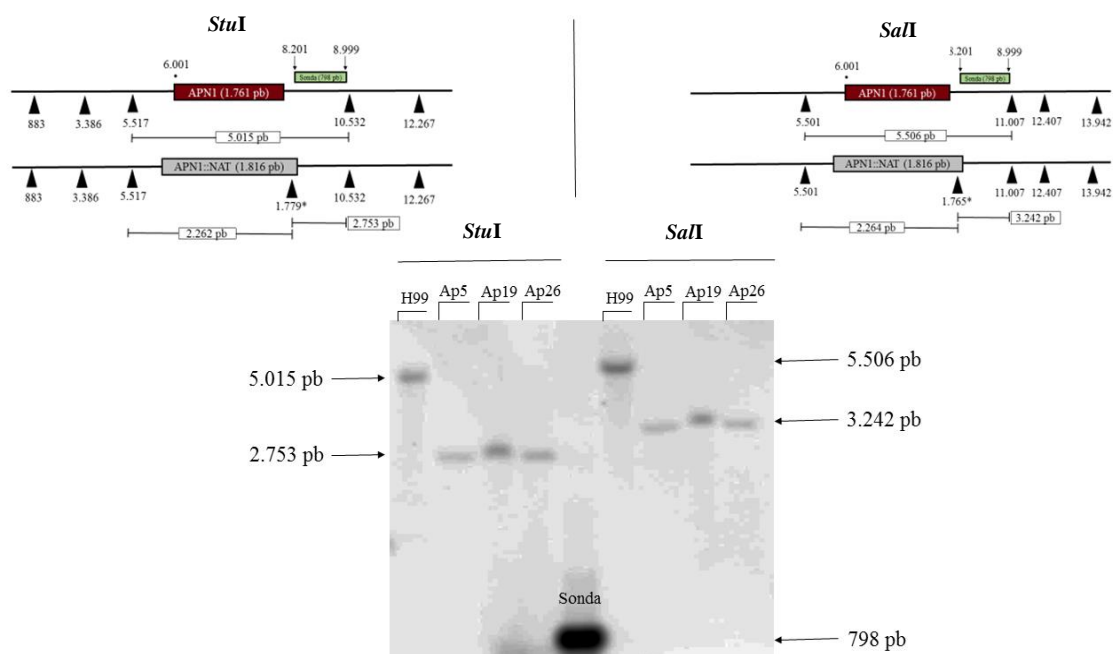


Figura 10. Confirmação de deleção do locus do gene *APN1* por Southern Blot. O gDNA dos fungos selvagem e mutantes foram incubados com as enzimas *StuI* e *SalII* separadamente e o padrão do tamanho dos fragmentos gerados foi analisado por Southern Blot. A marcação dos fragmentos foi realizada com a hibridização de sonda marcada com Dioxigenina. Pontas de setas – Sítios de clivagem das enzimas.

Na identificação de mutantes *apn1Δ*, a presença de um sítio de clivagem na sequência do cassete de deleção permitiu a identificação de fragmentos de DNA menores (2.753 para *StuI* e 3.242 pb para *SalII*), quando comparado aos gerados após a clivagem do DNA genômico (gDNA) do fungo da linhagem selvagem (5.015 para *StuI* e 5.506 pb para *SalII*) o que confirma a inserção do cassete de deleção no locus correto (**Figura 10**).

5.4. Mutantes *apn* não apresentam sensibilidade a agentes estressores osmóticos ou de parede celular quando cultivados em meio sólido.

Para avaliar a viabilidade dos mutantes da via BER em resposta a agentes estressores foram realizados testes de sensibilidade em diferentes meios de cultura e condições de tratamento. Os fenótipos foram analisados a partir da capacidade de crescimento em meios sólidos contendo diferentes agentes estressores. Os agentes utilizados e seus mecanismos de indução de estresse estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3. Descrição dos mecanismos de ação dos agentes estressores usados neste trabalho.

| Estresse | Agente | Concentração | Mecanismo de ação |
|----------------|-------------------------------|------------------------|---|
| Membrana | NaCl | 1,5 M | Indução de estresse iônico |
| | KCl | 1,5 M | Indução de estresse iônico |
| | SDS | 1% | Desestabilização de lipídeos da membrana celular. |
| | Sorbitol | 2,5 M | Estresse osmótico |
| pH | YPD | pH 4,0 | |
| Parede Celular | Caféina | 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL | Inibe a via Tor1 e ativa a via PKc1/Mpk1 controlando o remodelamento e manutenção da parede celular |
| Oxidativo | H ₂ O ₂ | 1 mM; 3 mM; 5 mM | Espécie reativa de oxigênio que induz estresse oxidativo. |
| | Menadiona | 0,03 mM | Estresse oxidativo. |
| | *CdSO ₄ | 32,5 µM | Estresse iônico / metálico |
| Genotóxico | Hidroxiurea | 110 mM | Inibe as ribonucleotídeo redutases |
| | MMS | 0,2 % | Agente alquilante que bloqueia a leitura e replicação do DNA |
| | EMS | 0,2 % | Agente alquilante que bloqueia a leitura e replicação do DNA |
| | Metoxiamina | 10 mM | Se liga a sítios abásicos no DNA bloqueando o reconhecimento e o reparo do DNA. |

Inicialmente, foi analisado se os genes *APN1* e *APN2* afetam o crescimento e a viabilidade de *C. neoformans*. Nenhum efeito relevante no crescimento das linhagens mutantes em YPD sólido ou qualquer alteração relevante na cinética de crescimento em meio YPD líquido foi observado. Os ensaios foram realizados às temperaturas de 30 °C e 37 °C e as taxas de crescimento das linhagens foram comparadas ao crescimento da linhagem selvagem (**Figura 11**).

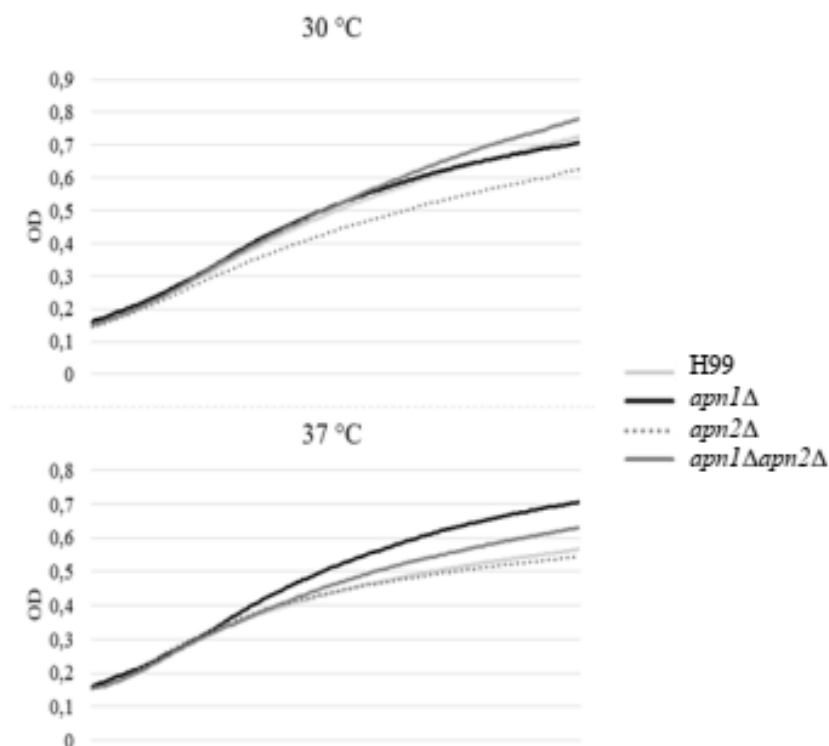
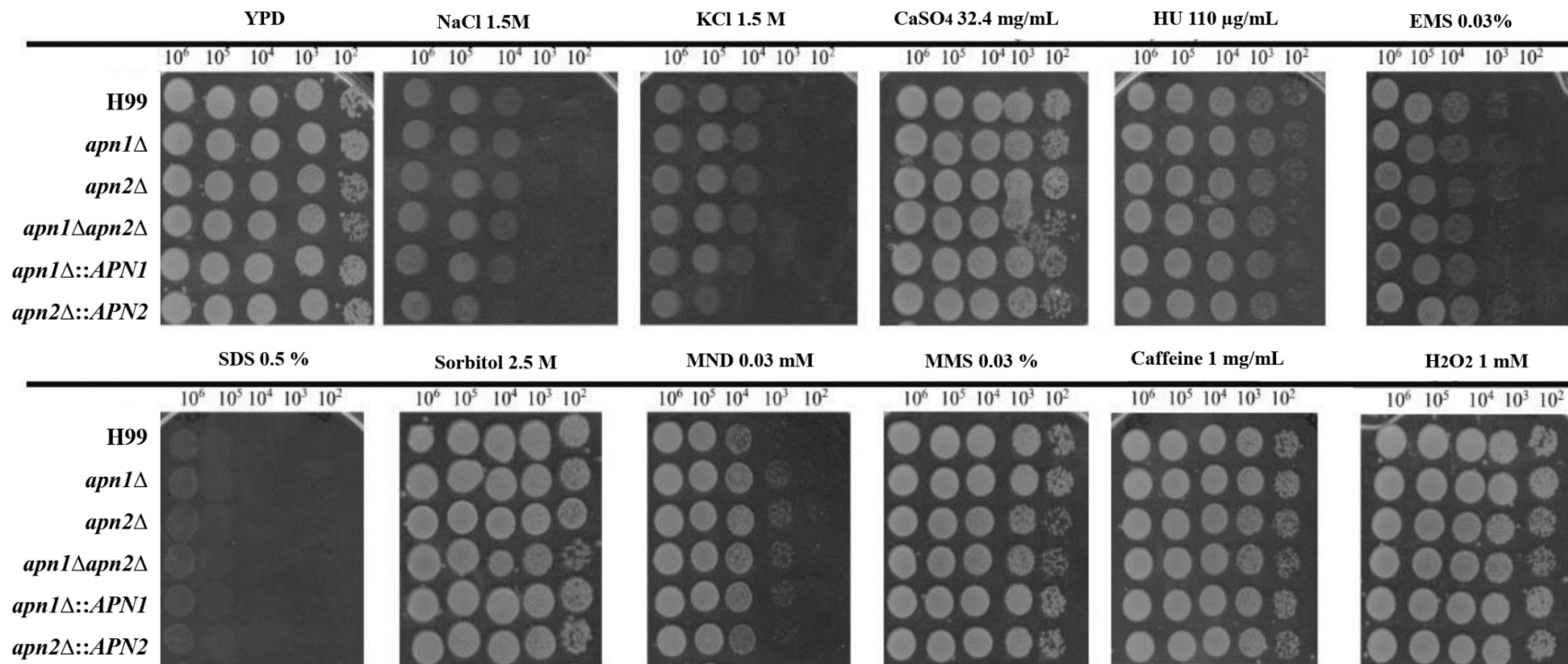


Figura 11. Efeito da deleção dos genes *APN1* e *APN2* sobre o crescimento de *C. neoformans*. Leveduras de *C. neoformans* na concentração de 10^5 cel/ mL foram inoculadas em meio YPD líquido e cultivadas a 30 °C e 37 °C. O crescimento celular foi determinado por meio de densidade óptica a 600 nm (OD 600 nm) a cada 24 h, por um total de 96 h.

A exposição dos mutantes ao agente genotóxico sulfato de Cádmio (CaSO_4), ou a agentes estressores de membrana, ou osmóticos, como cloreto de sódio (NaCl 1,5 M) e cloreto de potássio (KCl 1,5 M), não afetou o crescimento dos mutantes, sendo observado um perfil semelhante ao apresentado pela linhagem selvagem (**Figura 12**). O crescimento dos mutantes apresentou sutil alteração quando expostos a agentes estressores de parede: sódio dodecilsulfato (SDS 0,05%) e Sorbitol (2,5 M) ou cafeína (0,05 e 0,1 mg/mL) (**Figura 12**).

A

30 °C



B

37 °C

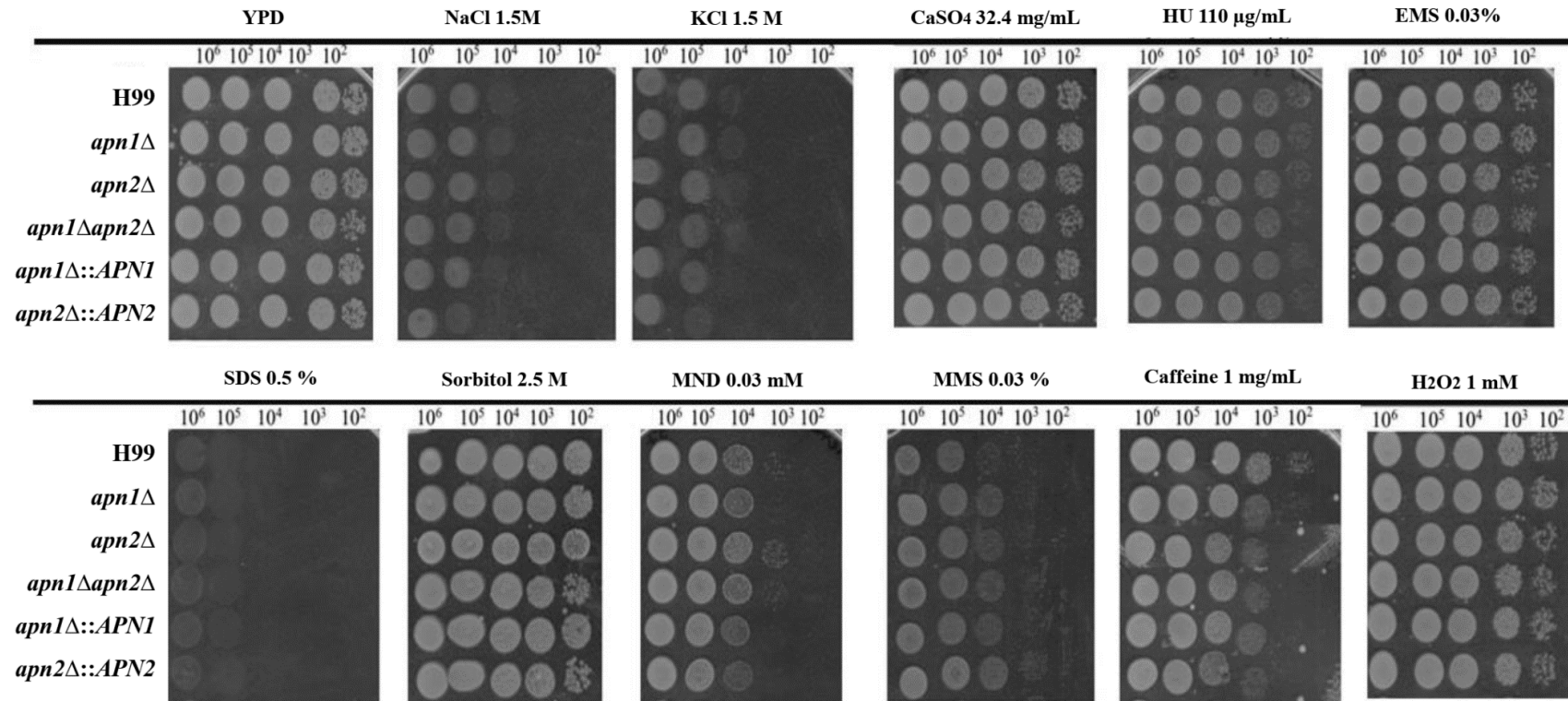


Figura 12. Fenótipos relacionados à temperatura e ao estresse celular químico dos mutantes de genes *APN-like* de *C. neoformans*. Diluições em série de dez vezes para as cepas indicadas foram aplicadas em YPD sólido suplementado com diferentes compostos a 30 °C (A) e 37 °C (B). O crescimento foi avaliado após 48 h de incubação. EMS: etilmetanossulfonato; MMS: sulfonato de metileno; HU: hidroxureia; MND: Menadiona).

Foi avaliada a capacidade de crescimento das linhagens na presença de agentes causadores de estresse oxidativo e apenas uma sutil resistência pôde ser observada nas linhagens mutantes *apn1Δ*, *apn2Δ* e *apn1Δapn2Δ* após exposição à Menadiona (0,03 mM). Não foi observada sensibilidade ou resistência ao agente peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 1 mM) ou ao nitrito de sódio (NaNO₂) (**Figura 13**). Esses resultados demonstram que os genes *APN1* e *APN2* de *C. neoformans* não são essenciais para o crescimento ou para os mecanismos de resposta de *C. neoformans* aos agentes estressores citados.

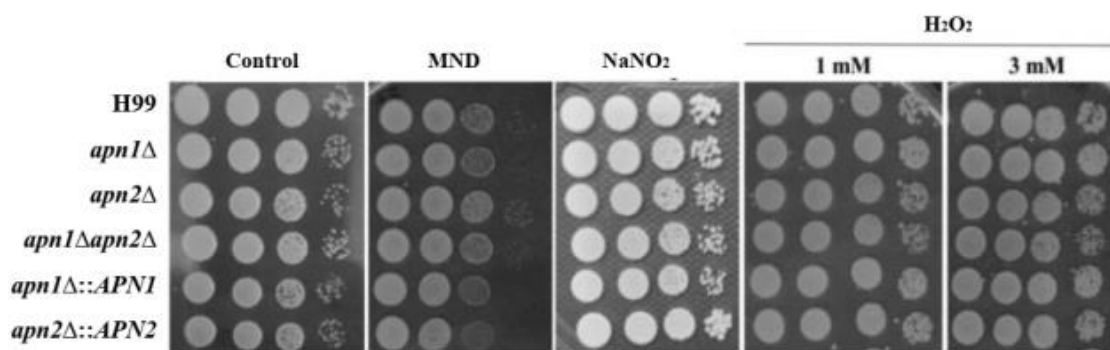


Figura 13. Os mutantes *apn1Δ*, *apn2Δ* e *apn1Δapn2Δ* não são suscetíveis a agentes oxidantes em meio sólido. Culturas de leveduras de *C. neoformans* WT, linhagens mutantes e reconstituídas foram diluídas em série de dez vezes e inoculadas em ágar YPD suplementado com 0,03 mM de menadiona (MND), 4 mg / mL de nitrito de sódio (NaNO₂) ou 1 ou 3 mM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O crescimento foi acessado após 48 h de incubação, a 30 °C, protegido da luz. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

Para determinar o papel da via de BER na biologia de *C. neoformans*, cepas mutantes foram construídas nas quais os genes *APN1* e *APN2* foram deletados por biolística. Foi demonstrado que a deleção de genes BER separadamente ou simultaneamente gerou mutantes viáveis, indicando que nenhum dos genes é essencial para o crescimento de *C. neoformans* em condições laboratoriais padrão. As morfologias da colônia dos mutantes de BER não diferiram de colônias da linhagem selvagem sob condições controle, sem indução de estresse. A deleção dos genes *APN1* e *APN2* do genoma de *C. neoformans* não induz mudanças na morfologia ou fenótipos em resposta aos estressores da parede celular ou de membrana (**Figura 12**). Esse padrão de resultados também é observado em outros fungos, como *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *S. pombe* (R E Johnson et al. 1998; M. Legrand et al. 2008; Ribar, Izumi, and Mitra 2004).

Os estudos das vias BER de diferentes fungos resultaram em padrões de fenótipos muito específicos, de acordo com cada organismo. Em *S. cerevisiae*, a deleção de *APN2* não tem efeito sobre a viabilidade ou crescimento celular, e o mutante *apn1Δapn2Δ* também cresce normalmente (Boiteux and Guillet 2004c). Estudos de Legrand et al.

caracterizaram a via BER de *C. albicans* (M. Legrand et al. 2008). Os autores geraram cepas mutantes para uma glicosilase que corrige especificamente guaninas oxidadas, conhecida como proteína OGG1, e também para duas endonucleases Apn1 e Ntg1. As cepas mutantes *ogg1Δ*, *ntg1Δ* e *apn1Δ* não apresentaram alterações na capacidade de crescimento, quando comparadas à cepa selvagem (M. Legrand et al. 2008).

A deleção dos genes *APN* de *C. neoformans* não induziu diferenças significativas na resposta do fungo à diferentes fontes de estresse oxidativo (H₂O₂, MND ou NaNO₂), fenótipo semelhante ao observado para linhagens *apn1Δ* mutantes de *C. albicans*, expostas ao H₂O₂ (M. Legrand et al. 2008). Em contrapartida, o mutante *apn2Δ* apresentou sensibilidade em resposta ao H₂O₂ (Ribar, Izumi, and Mitra 2004; Osman et al. 2003). Em *S. cerevisiae*, a deleção simultânea das proteínas Ntg1, Ntg2, and Apn, todas da via BER, resultou em aumento da recombinação e das taxas de mutação, mas não influenciou diretamente na resposta aos agentes oxidantes H₂O₂ e Menadiona (Swanson et al. 1999).

5.5. Mutantes *apn2Δ* e *apn1Δapn2Δ* apresentam alta sensibilidade à radiação UV.

A fim de avaliar o envolvimento da via BER de reparo na correção de lesões alçilantes induzidas pela radiação UV, os fungos das linhagens mutantes e selvagem foram submetidos às diferentes intensidades de radiação UV e o crescimento em meio YPD foi medido após 48 h. Os resultados apresentados na **Figura 14** revelam a sensibilidade das linhagens *apn2Δ* e *apn1Δapn2Δ* à radiação a partir da 120 J/m². A dificuldade de crescimento dos fungos foi diretamente proporcional ao aumento da energia de radiação (**Figura 14 A e B**). Diferente do observado nos ensaios de sensibilidade a agentes estressores, o fenótipo de sensibilidade à radiação UV apresentado pelo duplo mutante *apn1Δapn2Δ* foi mais expressiva do que o observado para o mutante *apn2Δ*, o que pode sugerir ação sinérgica após deleção simultânea de ambos os genes *APN1* e *APN2*.

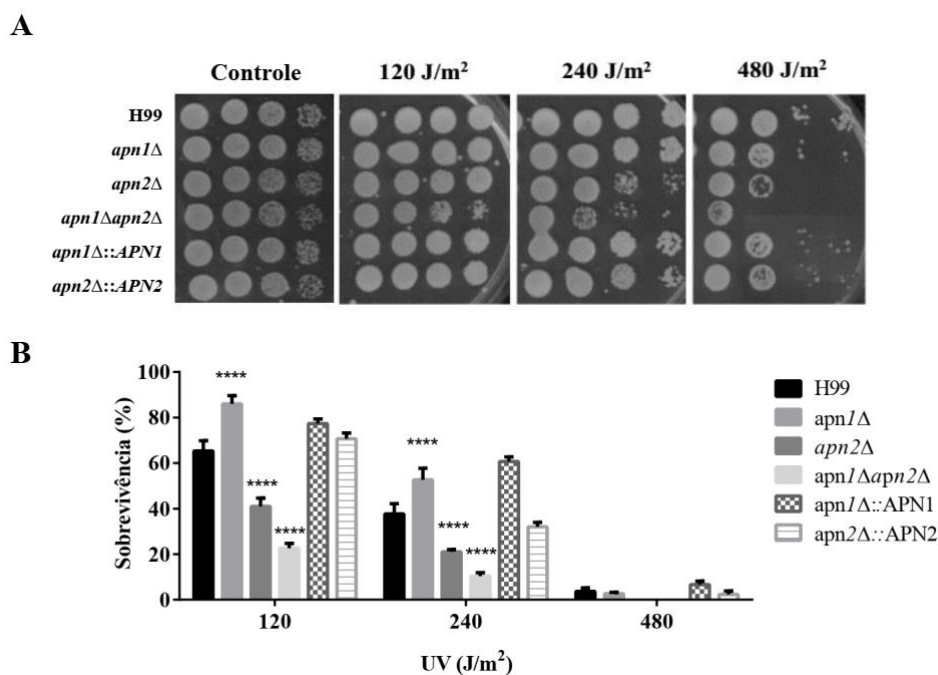


Figura 14. Ensaio de viabilidade após o tratamento das células com diferentes intensidades de radiação UV. **A)** Culturas de leveduras de *C. neoformans* WT, linhagens mutantes e reconstituídas foram diluídas em série de dez vezes e inoculadas em ágar YPD e expostas à diferentes energias de radiação UV. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa 30 °C e observadas após 48 h de crescimento. **B)** Um total de 5×10^2 células de *C. neoformans* foram plaqueadas em YPD sólido e expostas à radiação UV nas energias de 120, 240 e 480 J/m² a 254 nm. O grupo controle refere-se às diferentes culturas em meio YPD sólido sem exposição à radiação UV. As culturas foram incubadas a 30 °C por 48h, protegidas da luz para contagem de UFC. O gráfico representa a porcentagem de células viáveis dos tratamentos normalizada pela porcentagem de células viáveis do grupo controle (células da linhagem selvagem H99). *One-Way analysis of variance* (ANOVA) com pós-teste de Dunnet foi usado para comparar as médias dos resultados obtidos em três experimentos diferentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. **** $p < 0,0001$.

O duplo nocaute dos genes *APN1* e *APN2* (mutante *apn1Δapn2Δ*) de *C. neoformans* apresentou maior sensibilidade comparado aos fenótipos observados nas linhagens mutantes *apn1* e *apn2*. A susceptibilidade das linhagens mutantes à radiação UV foi quantificada utilizando técnica de análise da viabilidade celular por contagem de UFC após exposição às energias de radiação a 120, 240 e 480 J/m². Os resultados indicam que a deleção do gene *APN2* afeta significativamente a viabilidade de *C. neoformans* em resposta à exposição à radiação UV. A sensibilidade do mutante *apn2Δ* é dose dependente, como mostrado na **Figura 14**. O mutante *apn1Δ* apresentou moderada resistência à radiação UV e o duplo mutante apresentou-se mais susceptível do que o mutante *apn2Δ*. Esse resultado indica um efeito aditivo de sensibilidade, quando da deleção conjunta de ambos os genes *APN1* e *APN2*.

Diante dos resultados obtidos após ensaio de sensibilidade às lesões alcilantes geradas por radiação UV, as linhagens foram testadas quanto a sensibilidade às concentrações crescentes de diferentes drogas mutagênicas. A sensibilidade foi avaliada pela capacidade de crescimento em meio sólido e foram considerados sensíveis as linhagens, cujo perfil de crescimento tenha diminuído em resposta à exposição à droga em pelo menos uma diluição. Os resultados podem ser observados na **Figura 15**.

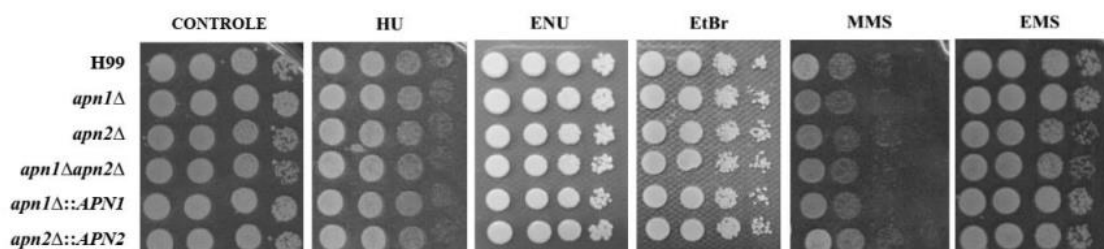


Figura 15. Avaliação do fenótipo de cepas *C. neoformans* mutantes de BER após a exposição a agentes alcilantes de DNA. As diferentes cepas foram diluídas em série e plaqueadas em YPD ágar suplementado com agentes indutores de danos no DNA: 0,03% metano-sulfonato de metila (MMS), 0,04% de metano-sulfonato de etila (EMS), 200 µg / mL N -etil-N-nitrosourea (ENU), brometo de etídio 20 µg / mL (EtBr) ou hidroxureia 110 mM (HU). As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

O crescimento dos mutantes não apresentou distinção daquele apresentado pelo fungo selvagem após os tratamentos com Hidroxureia (HU, 110 Mm), com agentes alcilantes metil metano-sulfonato (MMS, 0,03%), etil metano-sulfonato (EMS, 0,04%), ou ao agente intercalante brometo de etídeo (EtBr, 20 µg/mL) (**Figura 15**). Foi observado que as linhagens mutantes para apenas um dos genes (*apn1Δ* e *apn2Δ*) também não apresentaram diferenças na resposta à exposição ao N-etil-nitrosourea (ENU) (200 µg) (dados não mostrados). Esses resultados foram observados em mais de um experimento independente. De modo similar, as análises realizadas em maiores concentrações das drogas testadas não revelaram diferenças significativas quanto ao crescimento celular em presença de concentrações crescentes de MMS, EMS, ou CdSO₄ (**Figura 16**).

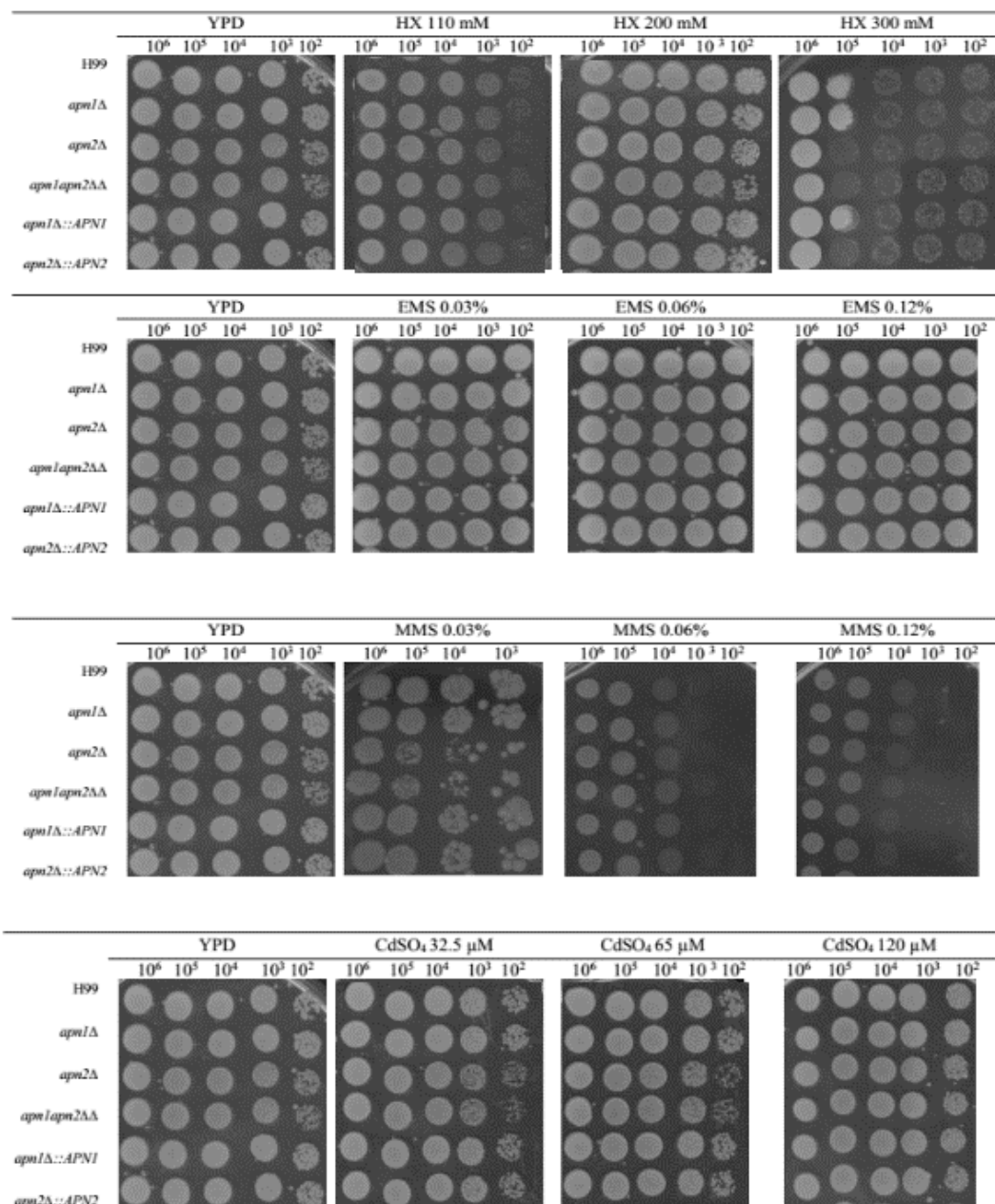


Figura 16. A deleção dos genes de reparo não induziu sensibilidade a drogas genotóxicas em meio sólido. Os genes de reparo selecionados para esse estudo não se mostraram indispensáveis ao crescimento em temperaturas de 37 °C ou em outras condições de estresse. As diferentes linhagens mutantes e o tipo selvagem foram diluídas em série (10x por ponto – ver métodos) e 5 μL de cada diluição foram semeados em meio ágar: YPD, metil metanosulfonato (MMS), etil metanosulfonato (EMS), sulfato de cádmio (CdSO₄), e hidroxíurea (HX) em diferentes concentrações. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C. A esquerda, crescimento em meio nutritivamente rico (YPD) como controle do experimento; a direita, crescimento em placas de ágar contendo os estressores na concentração indicada acima da imagem.

Em muitos organismos, cepas mutantes para reparo de DNA exibem diferentes susceptibilidades aos vários tipos de agentes que danificam o DNA. A sensibilidade à radiação UV, agentes oxidantes e agentes alquilantes, incluindo compostos conhecidos por induzir DSB, varia dependendo de cada via de reparo de dano ao DNA que seja modulada

(RD 1996; Wallace 2014; Ma, Westmoreland, and Resnick 2013; Ling et al. 2013) (Chauhan et al. 2005). Neste trabalho, foi demonstrado que a deleção de componentes BER de *C. neoformans* induz sensibilidade a drogas genotóxicas, como MMS, EMS e MX de maneira dose dependente. Da mesma forma, mutantes de BER também apresentaram alta sensibilidade à exposição à radiação UV e à droga genotóxica Zeocina, agentes conhecidos por induzir SSB e DSB no DNA. Apesar da especificidade da via de BER para lesões oxidadas e não volumosas no DNA, estudos atuais têm demonstrado a dinâmica do reconhecimento de danos ao DNA e a superposição das atividades das vias de reparo do DNA na proteção celular (SenGupta et al. 2013; M. Li and Wilson 2014a; Lagerwerf et al. 2011; B and L 1994). Além disso, os homólogos humanos das proteínas Apn de levedura, proteínas APE1 e APE2 têm papel direto no reparo de DSB de DNA (Schrader et al. 2009; Hegde, Hazra, and Mitra 2008).

5.1. Mutantes BER apresentam sensibilidade dose dependente à exposição com os agentes MMS e EMS em altas concentrações.

Visando melhor entender o papel dos genes *APN1* e *APN2* de *C. neoformans*, as respectivas linhagens nocaute foram avaliadas quanto ao possível aumento de sensibilidade aos agentes MMS e/ou EMS, em meio líquido, como previamente descrito para mutantes *apn1Δ* de *S. cerevisiae* (Popoff et al. 1990). As linhagens foram incubadas com altas concentrações (0,1% e 0,2%) de MMS e EMS em meio YPD líquido durante 1 h, a 30 °C, sob agitação e a viabilidade celular foi determinada pela contagem de UFC. Os resultados são mostrados na **Figura 17**. A linhagem mutante *apn2Δ* foi hipersensível às altas concentrações de MMS (**Figura 17A**). A deleção do gene *APN2* de *C. neoformans* induziu sensibilidade aos tratamentos com 0,2% de EMS por 1 h (**Figura 17B**), e ao tratamento com 0,2% de MMS, sensibilizando as células fúngicas logo após 20 min de exposição à droga.

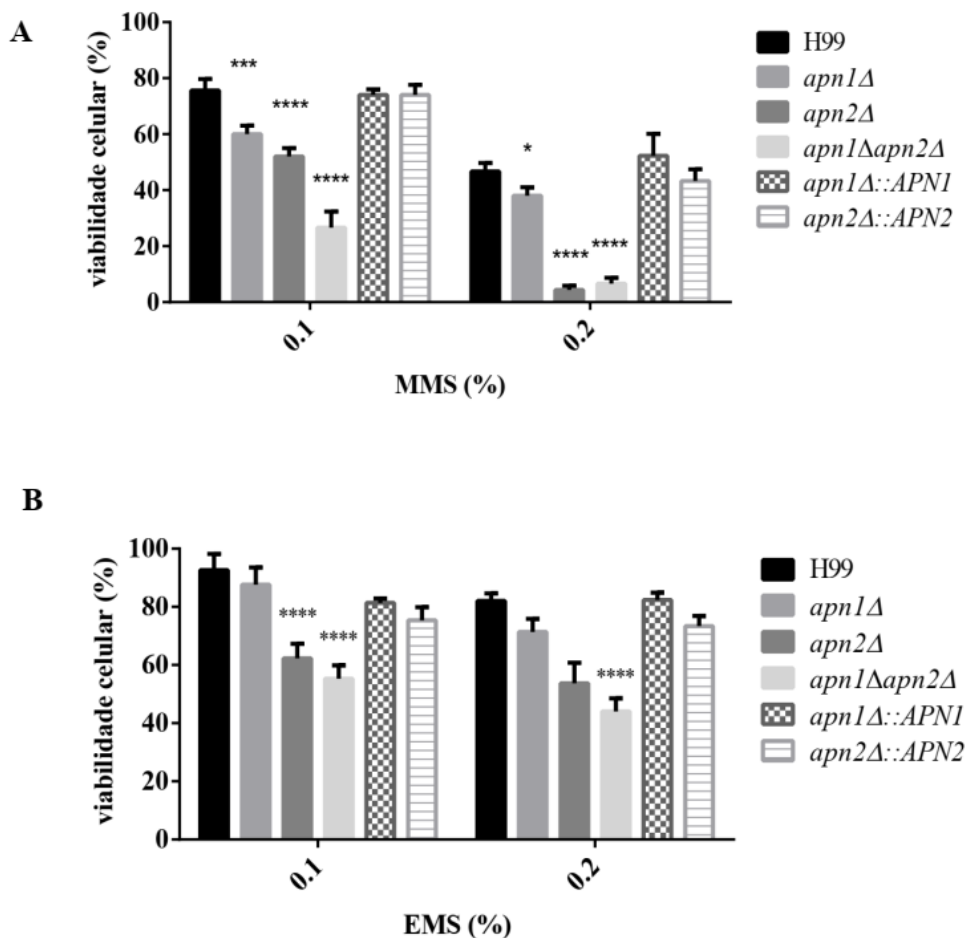


Figura 17. *apn2Δ* e *apn1Δapn2Δ* são sensíveis a diferentes ao MMS e EMS. Os fungos foram diluídos e incubados em meio YPD líquido contendo diferentes drogas genotóxicas, em diferentes condições. **A)** Viabilidade celular após exposição a 0,1 ou 0,2% MMS ou **B)** 0,1 ou 0,2% EMS. As cepas foram expostas aos agentes em YPD líquido por 1 h, a 30 ° C e 150 rpm. As células foram então lavadas com solução salina de tampão fosfato (PBS) e semeadas em ágar YPD para contagem de UFC. Os gráficos representam a porcentagem de células viáveis dos tratamentos normalizadas pela porcentagem de células viáveis do grupo controle. A cepa WT H99 foi usada como controle para análise estatística. ANOVA unilateral com o teste de comparações múltiplas de *Dunnnett* foi usado para comparar as médias dos resultados de três experimentos independentes. As barras de erro representam erros padrão da média. **** p <0,0001; *** p <0,001; * p <0,05.

A concentração de 0,2% de MMS reduziu drasticamente a contagem do número de colônias da linhagem *apn2Δ*, totalizando apenas 10% da sobrevivência, comparada a 50% das colônias da linhagem selvagem. A linhagem *apn1Δ* foi sensível apenas ao estresse induzido por MMS. Em comparação à linhagem selvagem e aos mutantes com deleção simples (apenas um gene), o duplo mutante *apn1Δapn2Δ* foi mais sensível às altas concentrações de ambos os agentes genotóxicos testados.

Estudos demonstraram que os mutantes BER e NER de *C. albicans* exibiram mesma susceptibilidade a EMS e MMS que a linhagem selvagem (M. Legrand et al. 2008; Melanie Legrand et al. 2007), sugerindo que as vias BER e NER desempenham um papel

importante no reparo de quebras de DNA neste organismo (M. Legrand et al. 2008; Melanie Legrand et al. 2007). Legrand e colaboradores observaram também que a deleção de *APN2* em *S. cerevisiae* não afetou sua resposta ao dano induzido por MMS, mas o duplo mutante *apn1Δapn2Δ* exibiu um aumento acentuado da sensibilidade a MMS em comparação com a cepa *apn1Δ* (M. Legrand et al. 2008; Melanie Legrand et al. 2007).

Em *S. pombe*, as cepas mutantes *nth1Δ* e *apn2Δ* foram sensíveis a MMS, enquanto a cepa *apn1Δ* também foi sensível ao estresse oxidativo. O mutante duplo *apn2Δapn1Δ* foi mais sensível ao estresse oxidativo do que o mutante *apn2Δ* (Ribar, Izumi, and Mitra 2004). A deleção de *APN2* em *S. pombe* também induziu sensibilidade à fleomicina, o que indica Apn2 como a principal endonuclease AP deste fungo (Ribar, Izumi, and Mitra 2004).

As diferenças observadas nas respostas das cepas mutantes de BER à radiação UV e agentes alquilantes de *C. albicans* e *S. cerevisiae* em comparação com *C. neoformans* e *S. pombe* podem estar associadas à estrutura das proteínas. Os homólogos humanos das proteínas Apn de *S. cerevisiae* estão envolvidos no reparo de DSB no DNA (Schrader et al. 2009; Burkovics et al. 2006) e a HsAPE2, especificamente, apresenta atividades de exonuclease 3' → 5' (correção de bases *mismatch* na porção 3' terminal), bem como de remoção de 3'-fosfoglicolato (Burkovics et al. 2006; Hossain, Lin, and Yan 2018; Hadi et al. 2002a). A Apn2 de *S. pombe* e a Apn2 predita de *C. neoformans* apresentam o mesmo domínio zf-GRF descrito como importante para a atividade 3' exonuclease de HsAPE2, que está ausente nas proteínas de *C. albicans* e *S. cerevisiae*, e também em CnApn1 (Figura 5). Tais observações sugerem que a AP-endonuclease 2 de *C. neoformans* potencialmente desempenha um papel em vias adicionais de reparo de DNA, além da BER, atuando provavelmente no reconhecimento e correção de SSB e DSB no DNA.

5.2. APN2 é importante para a resistência a drogas antifúngicas

Para avaliar o possível envolvimento das enzimas de reparo de DNA na susceptibilidade de *C. neoformans* a antibióticos, foi realizada diluição seriada das linhagens mutantes, reconstituídas e selvagem que foram plaqueadas em YPD ágar contendo concentrações definidas das drogas antifúngicas. A susceptibilidade ou resistência foi avaliada inicialmente de acordo como a capacidade de crescimento no meio após 48 horas de incubação. Os mutantes *apn2Δ* e *apn1Δapn2Δ* apresentaram dificuldade de crescimento em meio contendo Anfotericina B (8 µg/mL), Fluconazol (10 µg/mL) e

Zeocina (0,1%). A redução do crescimento visível em pelo menos uma diluição, foi considerada sensibilidade em relação à linhagem controle (YPD sem adição de droga). A exposição às drogas Terbinafina (1 µg/mL), Itraconazol (0,012 µg/mL), Cetoconazol (1 µg/mL), Nistatina (50 µg/mL) e Cerulonina (10 µg/mL), não induziu sensibilidade das linhagens mutantes, nas condições testadas (dados não mostrados).

5.3. A deleção de genes *APN* promove a redução das concentrações inibitórias mínimas de drogas antifúngicas.

A geração de espécies reativas de oxigênio pela Anfotericina B (AmpB) contribuiu para sua ação fungicida (Ferreira et al. 2013). Para avaliar o efeito da inibição da atividade de reparo de lesões oxidadas na resposta de *C. neoformans* às drogas antifúngicas, inicialmente foram determinados os valores de CIM para MX, AmpB, fluconazol, terbinafina, 5-Flucitocina para cada linhagem (**Tabela 4**).

Tabela 4. Valores de MIC de anfotericina B (AmpB), cloridrato de metoxiamina (MX) e fluconazol (Flu), 5-flucitosina (5-FLU) e terbinafina (Terb) contra H99, *apn1*Δ, *apn2*Δ e *apn1*Δ*apn2*Δ e as respectivas cepas reconstituídas.

| | Replicata 1 | | | | | Replicata 2 | | | | |
|--|-----------------|---------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|---------------|----------------|-----------------|------------------|
| | AmpB (µg/mL) | MX (mg/mL) | Flu (µg/mL) | Terb (µg/mL) | 5-flu (µg/mL) | AmpB (µg/mL) | MX (mg/mL) | Flu (µg/mL) | Terb (µg/mL) | 5-flu (µg/mL) |
| H99 | 0,25 | 1,25 | 2 | 1 | 4 | 0,25 | 1,25 | 2 | 1 | 4 |
| <i>apn1</i> Δ | 0,25 | 1,25 | 2 | 1 | 8 | 0,25 | 1,25 | 2 | 1 | 8 |
| <i>apn2</i> Δ | 0,125 | 0,626 | 1 | 1 | 8 | 0,125 | 0,626 | 1 | 1 | 8 |
| <i>apn1</i> Δ <i>apn2</i> Δ | 0,125 | 0,626 | 1 | 0,5 | 2 | 0,125 | 0,626 | 1 | 0,5 | 2 |
| <i>apn1</i> Δ:: <i>APN</i> 1 | 0,25 | 1,25 | 2 | 1 | 4 | 0,25 | 1,25 | 2 | 1 | 4 |
| <i>apn2</i> Δ:: <i>APN</i> 2 | 0,25 | 1,25 | 2 | 1 | 4 | 0,25 | 1,25 | 2 | 1 | 4 |

A linhagem de *C. neoformans* deletada para ambos os genes *APN1* e *APN2* apresentou redução nos valores de CMI para todas as drogas testadas. Em contrapartida, mutantes *apn1*Δ e *apn2*Δ apresentaram maior resistência ao tratamento com 5-flucitosina, caracterizado pelo crescimento fúngico em meio contendo maior concentração da droga. Os resultados de sensibilidade obtidos corroboraram aqueles observados por meio de crescimento em YPD sólido contendo as mesmas drogas (dados não mostrados).

A criptococose, causada por *C. neoformans* ou *C. gattii*, é uma doença fúngica significativa em todo o mundo, com alta incidência e morbidade (Mourad et al. 2018). Os pacientes tratados frequentemente apresentam recidiva devido ao ganho de resistência aos antifúngicos, o que leva a uma taxa de mortalidade de até 30% (Srikanta, Santiago-Tirado, and Doering 2014). Dado o uso difundido de tratamento antifúngico de longo prazo para prevenir a recorrência da infecção, o desenvolvimento potencial de resistência aos medicamentos representa uma séria ameaça para o controle da doença criptocócica.

Neste trabalho foi demonstrado que a interrupção dos genes da via BER de *C. neoformans* induziu sensibilidade dose dependente a diferentes drogas antifúngicas. A remoção dos genes *APN1* e *APN2* simultaneamente, foi capaz de reduzir a CIM de drogas como fluconazol e anfotericina B *in vitro*, dois antifúngicos largamente utilizados no tratamento de criptococoses.

Sengupta e colaboradores (2011) estudaram o envolvimento de APE1 humana no mecanismo de ativação do fator de transcrição proteína de ligação a Y-box (YB-1) no promotor do gene de resistência a multidrogas (MDR-1). Os pesquisadores descobriram que a proteína APE1 interage estavelmente com YB-1 e, quando acetilada, tem a ligação potencializada, levando a ativação do promotor. A acetilação de APE1 aumenta a interação entre p300 e YB-1 e, a formação do complexo no promotor do gene, o que induz a montagem da RNA polimerase II e consequente transcrição de MDR-1. (Sengupta et al. 2011).

Em fungos, transportadores ABC estão relacionados com a resistência a diferentes drogas, uma vez que potencializam o efluxo das mesmas, livrando a células dos efeitos nocivos dos compostos (Niimi 2010). A transcrição de transportadores ABC de membrana é regulada por Yap-1 (Paul, Doering, and Moye-Rowley 2015b). Assim, a maior sensibilidade às drogas observada para os mutantes em que não apresentam *Apn2* pode ter explicação segundo mecanismos transcricionais. Tal como ocorre em células tumorais humanas, em fungos a atividade transcricional e de reparo de DNA da proteína *Apn2* pode desempenhar papel importante na sensibilidade a drogas e, consequentemente, nos mecanismos de resistência a drogas.

Outra possibilidade está relacionada à resposta celular global aos danos no DNA, causados pelo tratamento com as drogas antifúngicas e acumulados pela inibição das atividades de reparo nos mutantes *apn2Δ* e *apn1Δapn2Δ*. Nesse contexto, as diferenças de sensibilidade às drogas decorreria de processos celulares secundários ativados em

resposta ao acúmulo de danos no DNA, não sendo atribuídas diretamente à atividade das enzimas Apn1 e Apn2, mas sim ao processo de resposta ao estímulo de danos no DNA. Essa proposição já vem sendo levantada por estudos realizados em células humanas em resposta ao tratamento com drogas genotóxicas alquilantes quimioterápicas (Fenske et al. 2006; Kiltie 2009). Os autores sugerem que as ações das proteínas de reparo do DNA podem ser altamente tóxicas para a célula, em vez de protetoras. Os desequilíbrios celulares podem surgir de diferentes situações genéticas (mutações, polimorfismos) ou variação epigenética (silenciamento heterocromático, regulação da transcrição mediada por microRNA) que podem alterar os níveis de expressão de proteínas ou suas atividades dentro de uma via de reparo de DNA (Fenske et al. 2006; Kiltie 2009; Moskwa et al. 2011).

Ambas as proposições apresentadas necessitam de maiores experimentações para serem confirmadas. Assim, estudos futuros são necessários para entender como as leveduras de *C. neoformans* se utilizam da maquinaria de reparo do DNA para responder aos estressores e às drogas antifúngicas. Análises genômica, transcriptômica e proteômica, poderão fornecer uma visão geral de como os níveis de componentes de reparo de DNA podem afetar a sensibilidade ou resistência às drogas. Contudo, independente do mecanismo, mudanças importantes foram observadas na resposta a drogas após deleção dos genes *APN1*, *APN2* do genoma de *C. neoformans*, e esses resultados apresentam-se promissores no estudo do processo de desenvolvimento de resistência/ susceptibilidade a drogas deste patógeno.

5.4.A inibição do reconhecimento de sítios abásicos pela Metoxiamina aumenta o efeito fungicida de Anfotericina B

Em seguida, foi avaliado se compostos que inibem as correções de lesões oxidativas, como metoxiamina (MX), quimioterápico utilizado no tratamento anticâncer, poderiam aumentar o efeito antifúngico da AmpB. As cepas mutantes *apn2Δ* e *apn1Δapn2Δ* apresentaram valores de CIM de 1,0 µg/mL de fluconazol, metade dos valores de CIM apresentados pelas cepas H99, *apn1Δ* e reconstituídas (2,0 µg/mL). Com base nesses valores, usamos diferentes combinações dos fármacos MX e AmpB para um ensaio *checkerboard*, para avaliar uma possível interação entre as drogas. A combinação de AmpB e MX apresentou sinergismo contra todas as cepas. A combinação dessas drogas foi mais eficaz contra as cepas *apn2Δ* (FICI = 0,187) e *apn1Δapn2Δ* (FICI = 0,219) do que para as cepas H99 (FICI = 0,375) e *apn1Δ* (FICI = 0,312) (**Tabela 5**).

Tabela 5. Valores CMI de anfotericina B (AmpB) e cloridrato de metoxiamina (MX) em combinações e valores de índice de concentração inibitória fracionária (FICI).

| Linhagem | Experimento 1 | | | Experimento 2 | | |
|-------------------|---------------|-------|--------|---------------|-------|--------|
| | CIMab | CIMba | FICI | CIMab | CIMba | FICI |
| H99 | 0,0625 | 0,292 | 0,50 | 0,0312 | 0,150 | 0,2498 |
| <i>apn1Δ</i> | 0,0156 | 0,292 | 0,3124 | 0,0625 | 0,078 | 0,3125 |
| <i>apn2Δ</i> | 0,0078 | 0,078 | 0,1874 | 0,0078 | 0,078 | 0,1874 |
| <i>apn1Δapn2Δ</i> | 0,0156 | 0,078 | 0,2498 | 0,0078 | 0,078 | 0,1874 |

CIMab: MIC de AmpB em combinação com MX. CIMba: CIM de MX em combinação com AmpB. As concentrações de AmpB são expressas em $\mu\text{g/mL}$ e para MX em mg/mL . O resultado do FICI foi interpretado da seguinte forma: $\leq 0,5$ -sinergia, $> 0,5$ e $\leq 4,0$ -indiferente, $> 4,0$ -antagonismo (Pfaller et al. 2015).

Os inibidores de BER estão sendo explorados vigorosamente como potencializadores da resposta das células cancerosas aos agentes alcilantes (L. Liu and Gerson 2004; Y, MJ, and JM 2005). Foram identificados vários inibidores da atividade de APE que sensibilizam uma variedade de tipos de células humanas a agentes alcilantes e metoxiamina é um desses inibidores que está sendo usado atualmente na clínica (L. Liu and Gerson 2004). A metoxiamina bloqueia a via BER reagindo com um grupo aldeído-açúcar do sítio AP, causando um intermediário estável (metoxiamina-AP) que bloqueia a atividade endonuclease da APE. Ao inibir a correção adequada pela via BER, a metoxiamina demonstrou potencializar a citotoxicidade de agentes alcilantes em uma variedade de tipos de células cancerígenas e modelos de xenoinxertos tumorais (Yan et al. 2006; Guerreiro et al. 2013; Rosa et al. 1991)

Foi demonstrado que o uso combinado da metoxiamina foi capaz de sensibilizar as células de *C. neoformans* ao tratamento com anfotericina B, mesmo em células da linhagem selvagem (Tabela 4). A exposição à MX também sensibilizou as leveduras ao estresse induzido por H_2O_2 (**Figura 18**). É a primeira vez que foi avaliada a utilização conjunta de um inibidor sintético específico de BER com um agente antifúngico contra *C. neoformans*. Esses resultados demonstraram que a utilização de metoxiamina potencializa a ação da anfotericina B contra *C. neoformans* induzindo a morte das células fúngicas em todas as linhagens testadas, inclusive na linhagem selvagem.

Frente a emergência de linhagens resistentes à drogas antifúngicas e o aumento da incidência de micoses invasivas e sistêmicas, a identificação de novos alvos antifúngicos tem importância imediata (J, MF, and TD 2012; Kyung J. Kwon-Chung and Chang 2012; Altamirano et al. 2017). Foi demonstrada a existência de sinergismo entre as drogas MX e AnfoB, com o aumento do efeito fungicida nas concentrações maiores que $75 \mu\text{g/mL}$

de MX. Embora as concentrações 75 e 150 $\mu\text{g/mL}$ de MX sejam maiores do que as utilizadas na clínica para tratamento de tumores (100 mg/m^2 ou 50 ng/mL de plasma) (Weiss et al. 2010), os resultados obtidos neste trabalho continuam promissores. O efeito sinérgico entre as drogas MX e AnfoB é um ponto de partida bastante interessante para análises futuras e apresenta a possibilidade do uso de inibidores de reparo de DNA como uma nova classe de adjuvantes do desenvolvimento de terapias antifúngicas.

5.5. Inibição de sítios AP pela MX aumenta a sensibilidade de *C. neoformans* aos danos causados por H_2O_2 .

Diante da ação de MX que atua diretamente na inibição do reconhecimento e da correção dos sítios abásicos pelas AP-endonucleases, foi investigado o efeito da exposição à MX combinada com o estresse oxidativo induzido por H_2O_2 , nas linhagens selvagem e mutantes para genes da via BER. As linhagens foram expostas ao H_2O_2 nas concentrações de 3 mM ou 5 mM, em combinação com MX 0,047 mg/mL , durante 1 h, a 30 °C e 150 rpm. A viabilidade celular foi determinada pela contagem de UFC. A exposição à 3 mM de H_2O_2 combinado com a MX reduziu a viabilidade celular para as linhagens *apn1 Δ* e *apn1 Δ apn2 Δ* (Figura 18 A), mas não para *apn2 Δ* . Após a exposição à 5 mM de H_2O_2 e MX, houve uma diminuição da viabilidade celular definida pela redução da contagem de colônias para todas as linhagens testadas (Figura 18 B).

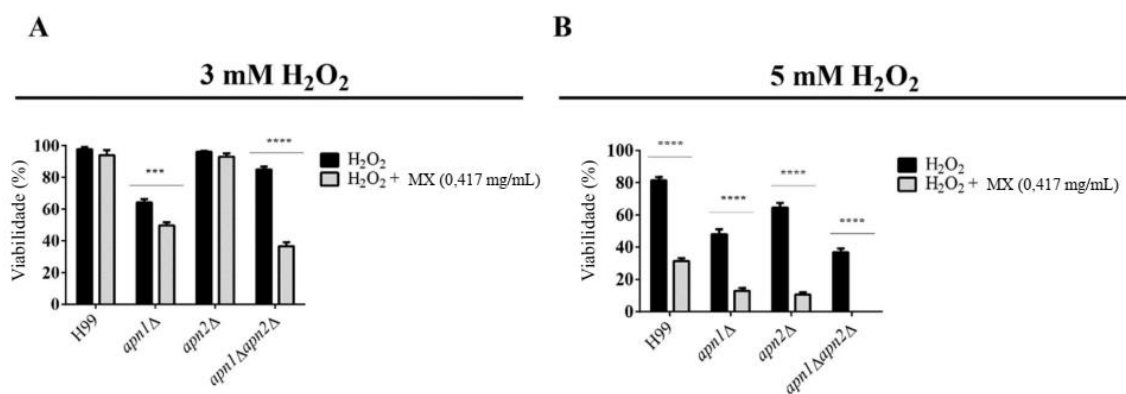


Figura 18. O tratamento com H_2O_2 e MX aumenta o efeito de H_2O_2 na viabilidade de *C. neoformans*. O gráfico mostra o perfil de sobrevivência celular das linhagens selvagem e mutantes de *C. neoformans* após exposição combinada a H_2O_2 e MX. As linhagens fúngicas foram cultivadas em YPD líquido contendo MX na concentração de 0,417 mg/mL e (A) 3 ou (B) 5 mM de H_2O_2 , durante 1 h, à 30 °C com agitação a 150 rpm. As células foram incubadas apenas em YPD contendo 3 ou 5 mM de H_2O_2 para análise comparativa. Os gráficos representam a porcentagem de sobrevivência de cada linhagem exposta às condições específicas de tratamento descritas, comparado à condição controle (meio YPD). Estatística realizada utilizando Two-Way ANOVA com comparações múltiplas (Sidak's test) das médias de três experimentos independentes. Barras de erro representam erro padrão da média. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$.

5.6. Deleção de *APN1* e *APN2* aumenta a sensibilidade aos danos causados pela exposição ao antibiótico Zeocina.

A Zeocina é uma droga da família das fleomicinas, e é considerada uma droga genotóxica que se intercala ao DNA, provocando quebras de dupla fita (Chankova et al. 2007). Para avaliar a influência das enzimas AP-endonucleases de *C. neoformans* no comprometimento da sobrevivência fúngica em resposta ao antibiótico Zeocina, as linhagens mutantes e selvagem foram expostas à droga em diferentes concentrações por 1 h, e o perfil de suscetibilidade foi avaliado. Os resultados são apresentados na **Figura 19**. A deleção dos genes *APN1* e *APN2* resultou em um aumento significativo da morte celular induzida pela exposição à Zeocina. A sensibilidade pode ser observada em todos os mutantes, sendo mais drástica nos mutantes *apn2Δ* e *apn1Δapn2Δ* (**Figura 19**).

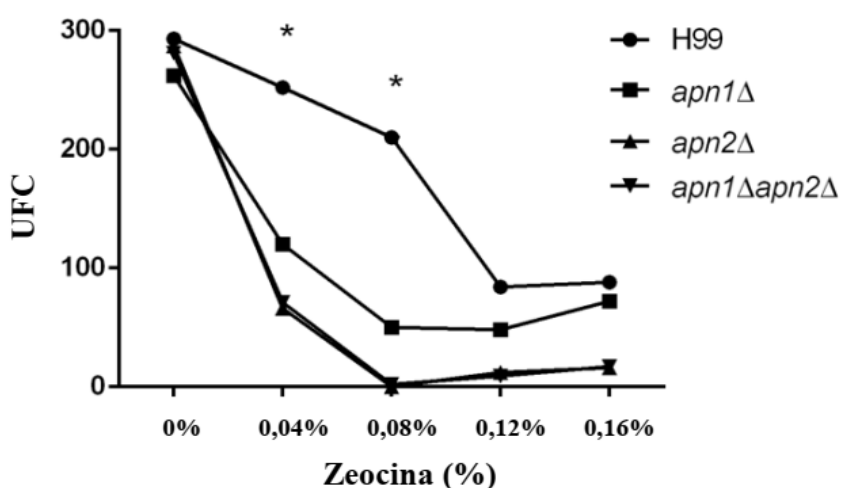


Figura 19. A deleção dos genes *APN1* e *APN2* sensibiliza *C. neoformans* ao tratamento com Zeocina. Fungos das linhagens selvagem e mutantes foram diluídos para a densidade de 5×10^6 cél/mL. Inóculos foram incubados em meio YPD contendo Zeocina nas concentrações 0,04%; 0,08%; 0,12% e 0,16%, por 1 h, a 30 °C. As células foram lavadas, diluídas e plaqueadas em meio sólido YPD para contagem de UFC. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h e as UFC contadas.

5.7. Deleção de *Apn1* e *Apn2* resulta em aumento da fragmentação do DNA induzida pela exposição à Zeocina.

Sendo a Zeocina uma droga, cujo mecanismo de ação, envolve lesões diretas no DNA, foi avaliada a integridade do DNA das linhagens após tratamento com concentração subletal da droga. Para tanto, as células foram expostas à Zeocina 0,08% por 1 h, lavadas e tiveram o DNA extraído. O perfil de fragmentação do DNA foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1%. Células não-expostas à Zeocina, bem como as

células das linhagens expostas no momento 0h, não apresentaram fragmentação do DNA detectável (**Figura 20**). A fragmentação do DNA foi observada após 1h de exposição a 0,08% de Zeocina em todas as linhagens. O mutante *apn2*Δ apresentou um aumento da fragmentação do DNA induzida por Zeocina, quando comparado ao perfil de fragmentação apresentado pela linhagem selvagem (também exposta) (**Figura 20**). O aumento na fragmentação do DNA em *apn2*Δ sugere uma redução na capacidade de reparo das lesões ao DNA causadas pela droga Zeocina.

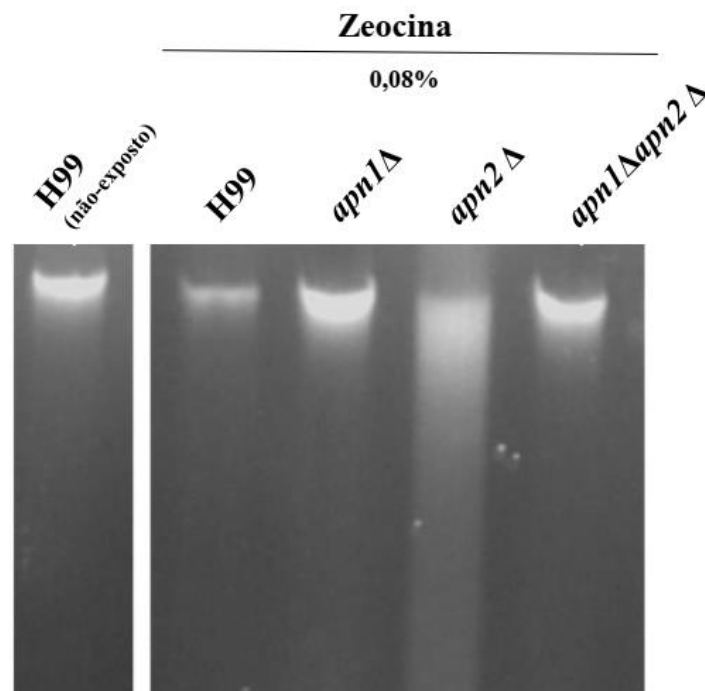


Figura 20. Deleção de *APN2* induz fragmentação de DNA em resposta à exposição de *C. neoformans* à Zeocina. Análise de integridade do DNA genômico por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/mL de EtBr. O DNA da linhagem selvagem H99 não exposta à droga foi usada como controle negativo de degradação do DNA (DNA genômico íntegro). As linhagens H99 e mutantes foram expostas à 0,08% de Zeocina em meio líquido por 1h. As células foram lavadas e o DNA extraído conforme descrito em Material e métodos. O resultado é representativo de três experimentos independentes.

Neste trabalho foi observado que a deleção do gene *APN2* de *C. neoformans* resultou em respostas alteradas aos agentes alcilantes, quando comparados à cepas selvagem e *apn1*Δ. A cepa *apn2*Δ de *C. neoformans* também apresentou redução da viabilidade e aumento da fragmentação do DNA genômico após exposição à Zeocina, uma droga da família Bleomicina. O mutante *apn1*Δ apresentou o fenótipo da cepa selvagem em resposta à exposição à Zeocina. Tomados em conjunto, esses dados sugerem que *Apn2* é o principal contribuinte, não apenas para a atividade AP-endonucleásica, mas

também para a atividade 3'-fosfodiesterase em *C. neoformans*. Curiosamente, embora a exposição à zeocina tenha induzido morte significativa em todas as cepas mutantes, ela não provocou fragmentação de DNA para a cepa duplo mutante *apn1Δapn2Δ*. Isso sugere que o mecanismo de morte induzido pela Zeocina pode ser diferente para este mutante, não necessariamente induzindo grande fragmentação do DNA, como por acúmulo de sítios abásicos, mas pelo bloqueio da transcrição do RNA e / ou pela parada do ciclo celular.

5.8. Os genes *APN1* e *APN2* não interferem na produção de urease.

A urease é uma enzima de considerável importância para o processo infeccioso e manutenção da sobrevivência do *C. neoformans* dentro do hospedeiro. Sendo uma enzima também secretada para o meio extracelular, a produção e atividade da enzima pode ser quantificada pela análise de alterações no meio de cultura, em especial, alteração na cor do meio em decorrência da alteração do pH (Feder et al. 2015). Para investigar a participação de enzimas de reparo de DNA na expressão de fatores de virulência, inicialmente foi analisada qualitativamente a produção e atividade da urease. A deleção dos genes *APN1*, *APN2* ou de ambos simultaneamente não influenciou a atividade de urease de *C. neoformans*, fenótipo observado tanto em meio sólido quanto em meio líquido (**Figura 21**)

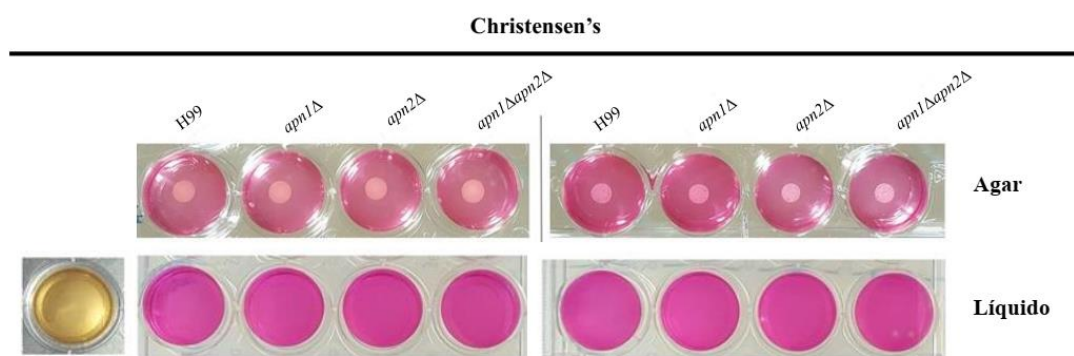


Figura 21. Avaliação da atividade da Urease. Um total de 5×10^6 cél/mL foi cultivado durante 48 h a 30 °C e 37 °C em meio *Christensen's* sólido e líquido contendo indicador de pH vermelho de fenol e solução de ureia. A coloração rosada indica atividade de urease. Poços contendo apenas o meio foram usados como controle de alteração de cor.

5.9. Deleção de *APN1* induz aumento na produção de fosfolipase

A atividade de fosfolipase secretada, um outro atributo de virulência desse fungo, foi avaliada após a deleção dos genes de reparo, através da medida do diâmetro de halo formado em meio de cultivo contendo ágar e emulsão de gema de ovo (Price et al., 1982). A formação do halo translúcido foi observada após crescimento das linhagens em estufa 30 °C por 72 h. O halo formado ao redor da colônia do mutante *apn1*Δ foi maior quando comparado ao fungo selvagem sob as mesmas condições testadas (**Figura 22**).

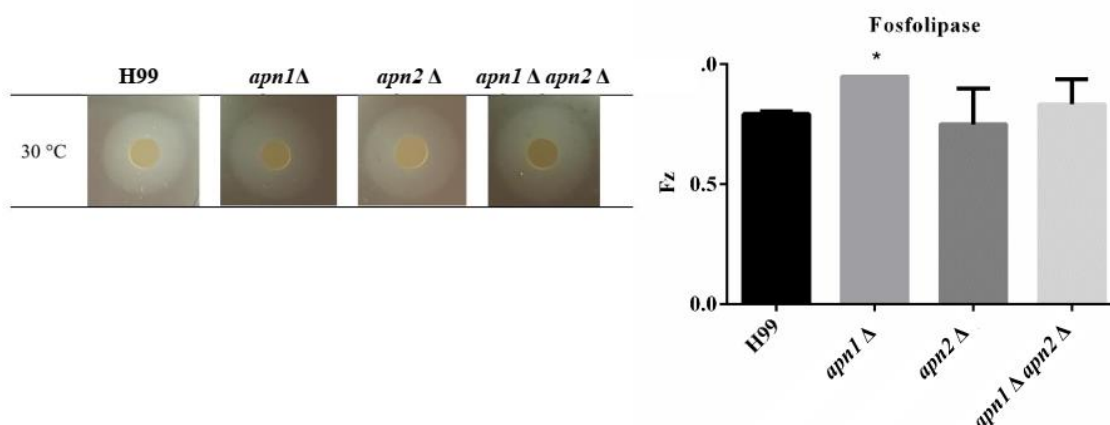


Figura 22. A atividade de fosfolipase foi aumentada após deleção do gene *APN1*. As células foram cultivadas durante 72 h a 30 °C em meio ágar contendo gema de ovo. A presença de um halo translúcido ao redor das colônias indica atividade de fosfolipase. A atividade de fosfolipase (Pz) foi mensurada de acordo com Price et al. (1982). Teste estatístico: teste t * $p < 0.05$. As barras de erro representam o desvio padrão da amostra. Experimento representativo de três com resultados similares entre eles.

5.10. A deleção de *APN2* retarda a produção de melanina por *C. neoformans*.

A melanina é um atributo de virulência associado à resistência ao estresse oxidativo e, por isso, muito importante para a virulência e patogenicidade de *C. neoformans* (R et al. 2003; PR 1997). Diante disso, a produção de melanina foi avaliada em meio mínimo (MM) líquido e sólido contendo tiamina e L-DOPA 1 mM, a 30 e 37 °C, sob abrigo da luz. Por ser um pigmento escuro, a detecção de sua presença dá-se pelo escurecimento do meio de cultura. A produção de melanina pelas linhagens *apn1*Δ *apn2*Δ somente foi observada após 144 h de cultivo, caracterizando um retardo na produção do pigmento por tais mutantes. O atraso no acúmulo do pigmento apresentado pelos mutantes *apn2*Δ e *apn1*Δ *apn2*Δ é revertido com a reconstituição do gene *APN2* nas linhagens mutantes (**Figura 23**) sugerindo uma possível relação entre o fenótipo observado e a ausência do gene.

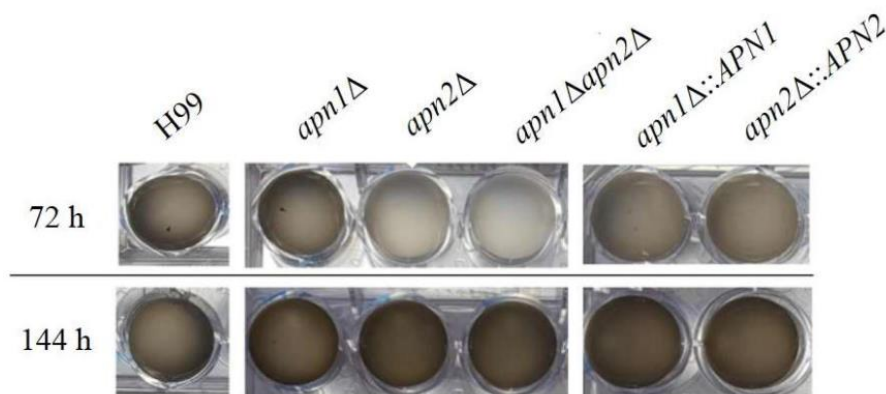


Figura 23. A produção de melanina por *C. neoformans* é afetada pela deleção de *APN1* e *APN2*. As leveduras foram cultivadas em MM durante 144 h a 37 °C, (150 rpm para meio líquido), na presença de 1 mM de L-DOPA, ao abrigo da luz. A imagem acima é representativa do acúmulo do pigmento após 72 h e 144 h de crescimento em meio indutor. A produção de melanina é atrasada nos mutantes *apn2Δ* e *apn1Δapn2Δ*, sendo apenas observada após 144 h de cultivo. Resultados semelhantes foram obtidos para incubação a 30 °C, em três experimentos independentes.

A sobrevivência de patógenos no interior de hospedeiros depende da produção de atributos que confirmam proteção contra as respostas de defesa do organismo infectado (Casadevall 2007). A melanina é um desses atributos e a sua síntese por *C. neoformans* tem sido associada à sua virulência uma vez que o pigmento confere proteção ao fungo contra fagocitose, lesão oxidada e morte fagocíticas (Sabiiti et al. 2014; BL and JD 2003; R et al. 2003; PR 1997). A produção de melanina é ativada em condições de estresse oxidativo e a melanização é crítica para a virulência de *C. neoformans* e outros fungos patogênicos (Casadevall 2007; BL and JD 2003; Nosanchuk, Stark, and Casadevall 2015).

Neste trabalho foi constatado que a deleção dos genes *APN* resulta em um atraso na produção de melanina por *C. neoformans*, sem influenciar na viabilidade ou crescimento celular. Na situação de ausência da atividade AP-endonucleásica, outros sistemas de reparo de DNA podem ser ativados para eliminar e reduzir os danos oxidados no DNA e permitir a síntese tardia da melanina. Esse pode ser o mecanismo que explica a retomada da produção de melanina pelos mutantes após 144 h (**Figura 23**). De acordo com estes resultados, não apenas a atividade AP-endonucleásica das proteínas Apns, mas também a geração/reparo dos sítios abásicos per si, desempenham papel importante na produção de melanina por *C. neoformans*.

5.11. A deleção de genes *APN* não interferem na produção de cápsula por *C. neoformans*.

A capacidade de produção de cápsula em condições de indução *in vitro* foi avaliada para as diferentes linhagens mutantes da via BER. As leveduras das diferentes

linhagens foram incubadas em meio indutor de cápsula (MM + tiamina), a 30 e 37 °C e a produção da cápsula polissacarídica foi visualizada e quantificada através do método de exclusão de nanquim. Não foram detectadas diferenças significativas de tamanho da cápsula entre as linhagens mutantes para a via BER e a linhagem selvagem H99 (**Figura 24**).

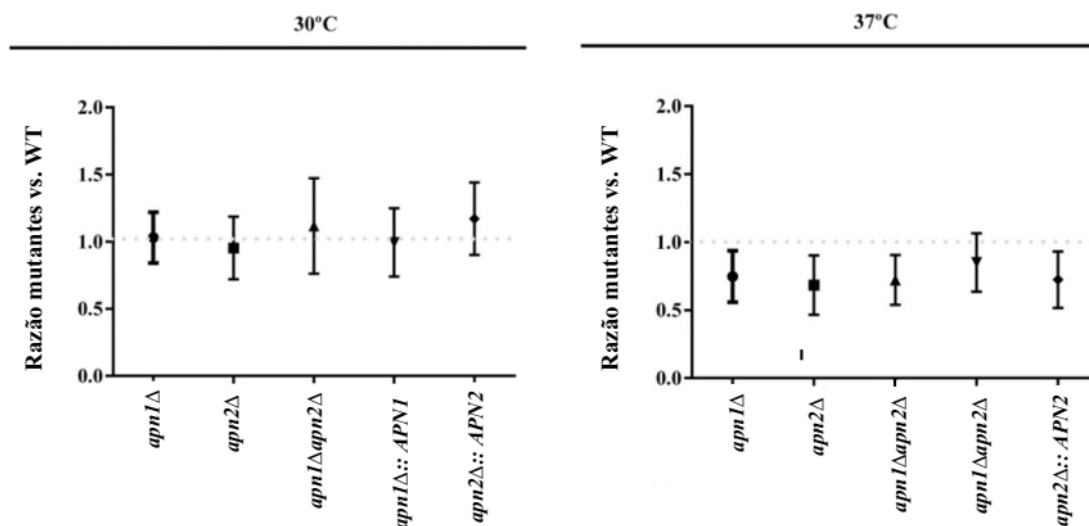


Figura 24. O tamanho da cápsula não foi alterado com a deleção de genes das vias BER de reparo de DNA. A cápsula foi detectada através do método de exclusão do nanquim. As imagens representativas das células observadas sob aumento de 35X para cada linhagem nas diferentes temperaturas de crescimento. As caixas representam 75 % da distribuição dos dados e as linhas pontilhadas horizontais representam as medianas. As barras indicam valores mínimos e máximos. Teste estatístico Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Resultados representativos de três experimentos independentes.

5.12. A redução na produção de melanina é decorrente do bloqueio do reparo de sítios abásicos nos mutantes *apn2Δ* e *apn1Δapn2Δ*.

Para avaliar a participação direta do reparo de sítios abásicos na produção de melanina em *C. neoformans*, as linhagens selvagem, mutantes e reconstituídas foram submetidas à tratamentos com MX em diferentes concentrações (0,417; 0,834 ou 1,67 mg/mL) durante 1h, a 30 °C, como mostrado na **Figura 25 A**. Os resultados demonstraram que a exposição das células fúngicas à MX na concentração de 0,417 mg/mL foi tolerada, uma vez que não foi detectada alteração nos níveis de viabilidade celular (**Figura 25A**). Diante disso, essa concentração foi padronizada para os próximos experimentos. Em seguida, as linhagens selvagem e mutantes foram expostas a MX (0,417 mg/mL) durante 1h, lavadas com PBS e incubadas em meio indutor da produção de melanina (**Figura 25B**).

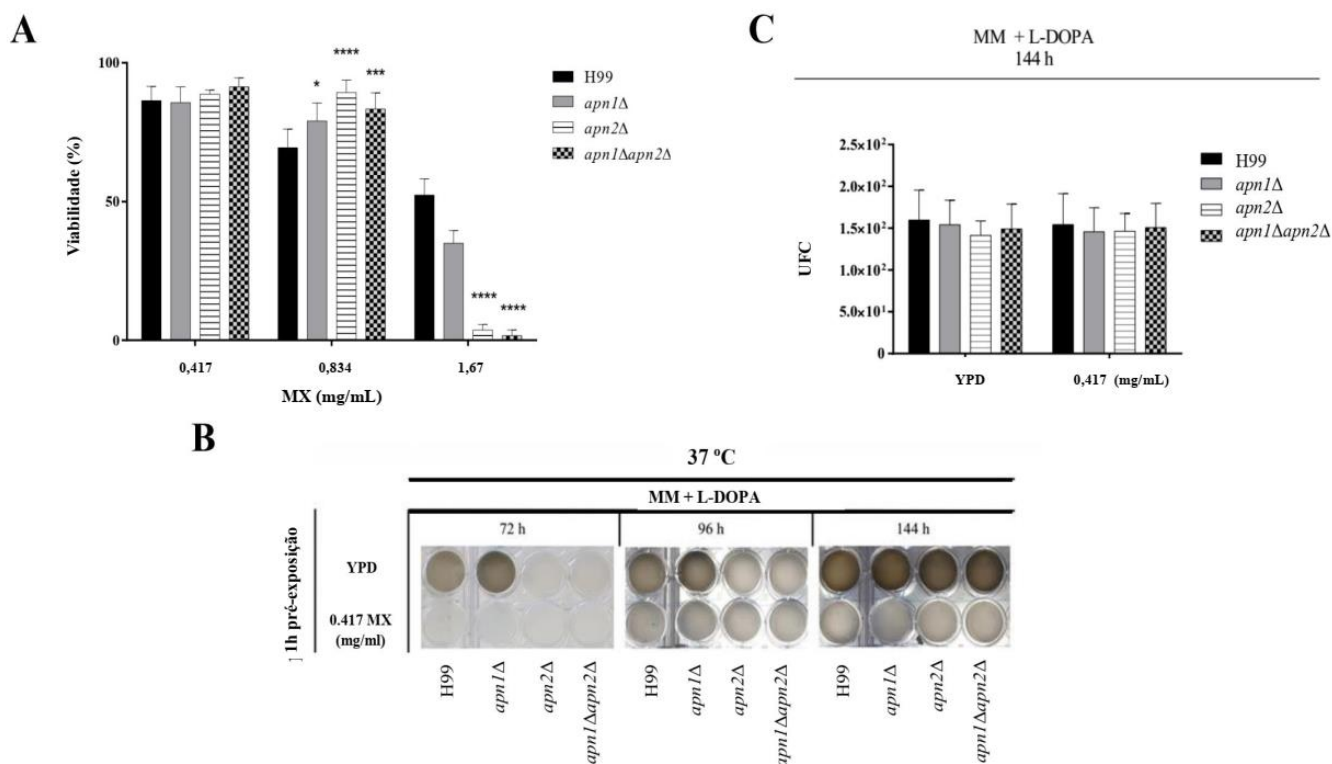


Figura 25. Os genes *APN1* e *APN2* são necessários para a produção de melanina por *C. neoformans*. **A**) Viabilidade de células de *C. neoformans* após exposição a metoxiamina (MX). As células das cepas WT e mutantes foram incubadas em meio YPD líquido por 1 h, a 30 ° C e 150 rpm na ausência (controle) ou na presença de MX (0, 0,417, 0,83 ou 1,67 mg / mL). As células foram então lavadas com PBS e o número de CFUs foi quantificado. O gráfico representa a porcentagem de sobrevivência de cada cepa exposta a MX em comparação com a condição de controle. O H99 selvagem foi usado como um grupo de controle para comparação estatística. *One-way* ANOVA com pós-teste de *Dunnnett* foi usado para comparar as médias dos resultados de três experimentos independentes. As barras de erro representam erros padrão da média. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$. **B**) Produção de melanina após exposição de células de levedura a MX. As células de cada cepa foram incubadas com 0,417 mg / mL de MX por 1 h, a 37 ° C, lavadas com PBS, diluídas e inoculadas para análises de produção de melanina. A detecção visual foi realizada diariamente e fotodocumentada após 72, 96 e 144 horas de crescimento. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. **C**) Viabilidade celular de cepas de *C. neoformans* após exposição a MX e indução da síntese de melanina. Alíquotas de suspensões de células foram coletadas das placas de ensaio de melanina após 144 h de incubação, e as células viáveis foram avaliadas por contagem de UFC. *One-way* ANOVA com pós-teste de *Dunnnett* foi usado para comparar as médias dos resultados de três experimentos independentes.

O pré-tratamento das linhagens selvagem e mutantes com MX (0,417 mg/mL) bloqueou completamente a produção da melanina, não sendo visível qualquer alteração na característica translúcida do meio indutor usado no teste (**Figura 25B**, painel superior). A inibição da produção de melanina foi também observada nos fungos da linhagem selvagem. Para confirmar a presença de células viáveis durante o experimento foi realizada a contagem de UFC no tempo de 144 h, a partir de alíquotas retiradas da placa teste (**Figura 25C**). Os resultados demonstram a viabilidade das células após tratamento com MX, indicando que a ausência de melanina é consequência de mecanismos inibitórios responsivos à MX, e não à morte celular (**Figura 25**

C). Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado se manteve o mesmo. A inibição da produção de melanina pelo tratamento com MX foi irreversível, sendo o fenótipo mantido ao longo dos 10 dias do experimento. Em contrapartida, a inibição do reparo de sítios abásicos pela MX não afeta significativamente a atividade de urease, outro importante atributo de virulência de *C. neoformans* (dados não-mostrados). A manutenção da atividade enzimática da urease foi observada também nas linhagens mutantes da via BER.

Foi comprovado que o pré-tratamento de células de *C. neoformans* com MX durante 1h foi capaz de bloquear a produção de melanina pelo fungo, mesmo na linhagem selvagem. A MX é altamente específica e se liga rapidamente ao sítio abásico no DNA, sendo o produto MX-AP forte e estável (Gurkan-Cavusoglu et al. 2013). Essas características bioquímicas do composto conferem ao processo de bloqueio da produção de melanina pela MX velocidade e estabilidade, já que a droga foi capaz de bloquear completamente a produção do pigmento durante todo o experimento (10 dias), mesmo após curto período de exposição.

Mutações e deleção de genes relacionados à cromatina, como HDACs, induzem a modulação da produção de melanina (Brandão et al. 2018). Neste trabalho, os autores demonstraram que deleções do gene *HOS3*, uma histona desacetilase envolvida na atividade de metiltransferase, resulta em um atraso de 96 h na produção de melanina, quando comparada com a cepa do tipo selvagem (Brandão et al. 2018). Este fenótipo ainda não é completamente entendido, mas conforme discutido por Brandão et al., perturbações nas conformações da cromatina e alterações nos complexos envolvidos na ativação da transcrição pode comprometer a transcrição dos genes da laccase o que, por sua vez, retarda a ativação de cascatas de sinalização envolvidas na produção de melanina (Brandão et al. 2018). Apesar de não terem sido realizados experimentos de quantificação de transcritos do gene codificador da laccase, os dados observados neste trabalho sobre a estrutura da sequência Apn2, especificamente a conservação do domínio zf-GRF, e a caracterização de Apn2 como uma transcrição fator de Jung et al. (2015)(Jung et al. 2015a), permitem sugerir o envolvimento da proteína Apn2 na regulação da transcrição de genes *LAC* de *C. neoformans*.

A associação da produção de melanina com a patogenicidade de *C. neoformans* é amplamente discutida (Magditch, Liu, Xue, Idnurm, et al. 2012; Brunke et al. 2014). Diversos estudos demonstraram a correlação entre a capacidade de *C. neoformans* de ser fagocitado e/ou de proliferar intracelularmente, com baixa reincidência da doença em pacientes (Sabiiti and

May 2012; Sabiiti et al. 2014; Alanio, Desnos-Ollivier, and Dromer 2011). Diante desses fatos, foi ampliada a análise para avaliar a sobrevivência dos mutantes *apn* durante a interação com macrófagos e a virulência em larvas de *G. mellonella*. Curiosamente, os mutantes *apn* foram menos internalizados e mais susceptíveis à neutralização pelos macrófagos M2 *in vitro* (**Figura 26**). O padrão de fenótipo dos mutantes de BER é congruente com a redução da produção de melanina, uma vez que a ausência do pigmento, mesmo por um período limitado, pode ser suficiente para sensibilizar o fungo à neutralização pelo hospedeiro.

Estudos em células humanas relataram a participação de lesões oxidadas e enzimas de reparo de DNA na modulação física da transcrição de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo (Fleming, Ding, and Burrows 2017; Ba et al. 2014). Uma das reações mais frequentes das espécies reativas de oxigênio com o DNA é a oxidação da guanina a 8-oxo-7,8-dihidroguanina pré-mutagênica (8-oxoG). Apesar da vulnerabilidade da guanina à oxidação, os genes de vertebrados estão principalmente embutidos em regiões genômicas ricas em GC, e mais de 72% dos promotores de genes humanos pertencem a uma classe com alto teor de GC. Ba e chuequin (2004) demonstraram que, em promotores, a lesão oxidativa 8-oxoG pode servir como uma marca epigenética e, quando complexado com a enzima de reparo oxidativamente inativada 8-oxoguanina DNA glicosilase 1, fornece uma plataforma para a coordenação das etapas iniciais de reparo do DNA e a montagem da maquinaria transcricional para lançar a expressão imediata e preferencial de genes regulados por redox. Esse estudo demonstra que, não apenas as enzimas de reparo, mas também as lesões propriamente ditas, tem papel importante da facilitação da transcrição de genes responsivos ao controle redox celular.

Os resultados obtidos nesta tese demonstram que o uso do inibidor indireto de APE1, Metoxiamina, foi capaz de bloquear a produção de melanina por *C. neoformans*, ou seja, a ligação da MX às lesões de sítios abásicos no DNA do fungo foi capaz de bloquear a produção e acúmulo do pigmento. Como a produção da melanin é controlada pela expressão do gene LAC (lacase), e sabendo que a melanina participa da proteção do fungo contra o estresse oxidativo, é possível sugerir que a expressão do gene da Lacase pode sofrer modulação em resposta à presença de lesões oxidativas no DNA, bem como pela presença de proteínas de reparo de DNA (e conseqüente correção das lesões). Essa sugestão precisa de embasamento experimental, contudo é de considerável relevância na caracterização de novos processos de controle transcricional.

5.13. Deleção dos genes *APN1* e *APN2* compromete a sobrevivência de *C. neoformans* no interior de macrófagos.

A fim de avaliar o impacto das diferenças fenotípicas observadas entre os fungos mutantes e o selvagem na interação patógeno-hospedeiro, foi realizado o ensaio de fagocitose por macrófagos. A suspensão contendo células fúngicas foi diluída e co-incubada com macrófagos primários diferenciados da medula de camundongos (BMDC do inglês, *Bone Marrow-Derived Macrophages*) conforme protocolo descrito em Materiais e métodos. Os resultados de porcentagem e índice de fagocitose não apresentaram diferenças significativas entre os mutantes. Além apresentar menos leveduras internalizadas por macrófago, o número de macrófagos sem leveduras internalizadas foi maior após incubação com mutantes *apn1* Δ , *apn2* Δ , e *apn1* Δ *apn2* Δ , apesar de os dados não serem estatisticamente significativos (**Figura 26 B**). Foi analisada também a sobrevivência fungica após internalização por macrófagos através da contagem de UFC após 2 h e 24 h de co-incubação. Os resultados demonstram que após 2 h de incubação com macrófagos o mutante *apn1* Δ *apn2* Δ apresentou redução significativa na contagem de UFC, o que indica maior susceptibilidade do duplo mutante à neutralização pelo macrófago (**Figura 26 C-D**). Após 24 h de interação os mutantes *apn2* Δ e *apn1* Δ *apn2* Δ apresentaram menor contagem de UFC, demonstrando menor capacidade de sobrevivência no interior de macrófagos (**Figura 26 D**).

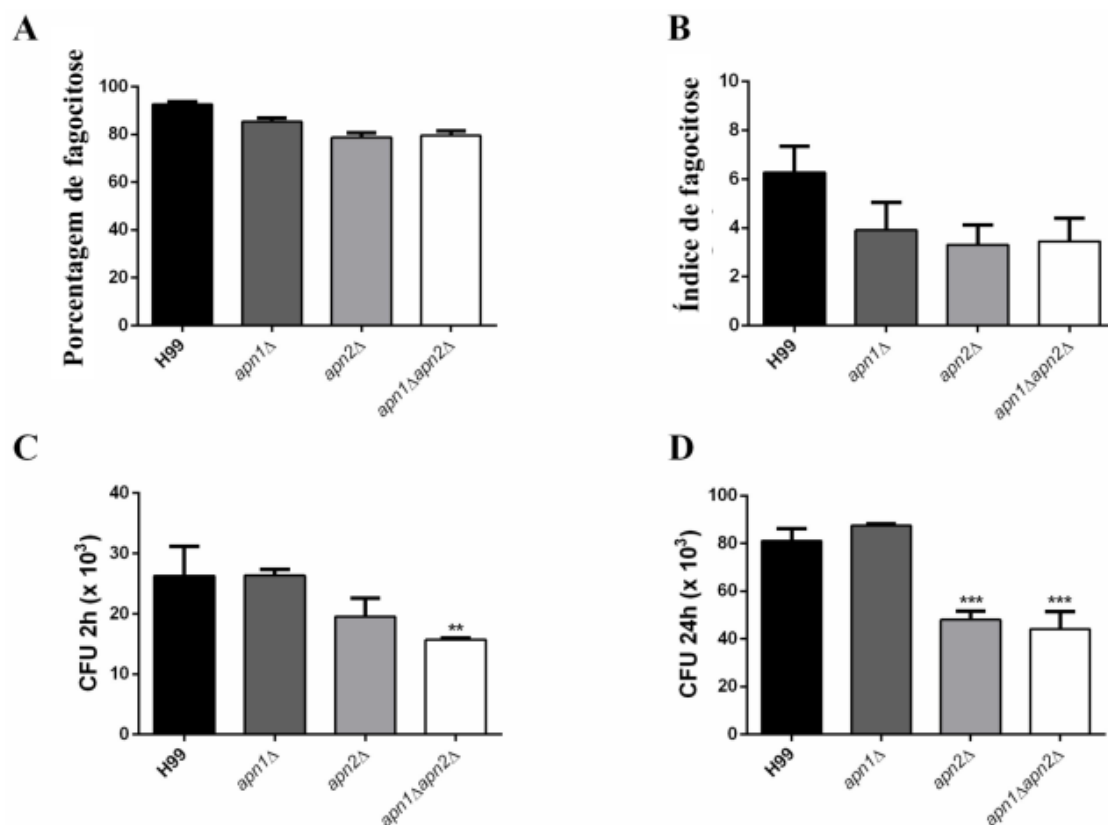


Figura 26. A ausência dos genes *APN* em *C. neoformans* reduziu a sobrevivência fúngica em macrófagos *in vitro*. BMDMs foram co-cultivados por 2 h ou 24 h com diferentes linhagens de *C. neoformans* previamente opsonizados com 10 µg/mL de anticorpo 18B7. Triplicatas de cada linhagem foram adicionadas a placa de 96 poços contendo os macrófagos M2 em um MOI (multiplicity of infection) de 5:1. (n = 3 experimentos, *** p < 0.001). **A)** Percentagem de fagocitose. Os resultados da porcentagem de fagocitose são apresentados como médias ± intervalo de confiança de 95% de células fagocíticas que internalizaram o fungo. **B)** Índice de fagocitose. Porcentagem de fagocitose foi calculada como a relação entre macrófagos que fagocitaram e todos os macrófagos contados. **C)** Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (CFU) recuperadas de BMDMs infectados com diferentes linhagens de *C. neoformans*, após 2 h, ou **D)** 24 h de infecção. as BMDCs foram lavadas, lisadas com solução de SDS (0,05%), semeadas em meio YPD e incubadas a 30 °C por 48 h. Os resultados são apresentados como médias. Os pontos representam os dados representativos de réplicas técnicas. Teste estatístico: One-way ANOVA com pós-teste de Dunnett** p < 0,01. Dados de três experimentos biológicos independentes.

5.14. A deleção de genes *APN* não induz efeitos significativos em modelo de infecção em *Galleria mellonella*.

Para avaliar os efeitos da deleção dos genes das AP-endonucleases na virulência de *C. neoformans* foi utilizado o modelo animal *Galleria melonela*. A infecção de galerias com as linhagens mutantes *apn2Δ* e *apn1Δapn2Δ* resultou em um retardo na cinética de indução de morte das lagartas, quando comparado à linhagem selvagem (**Figura 27**). A ausência de *APN1* não alterou significativamente a virulência de *C. neoformans* neste modelo de estudo.

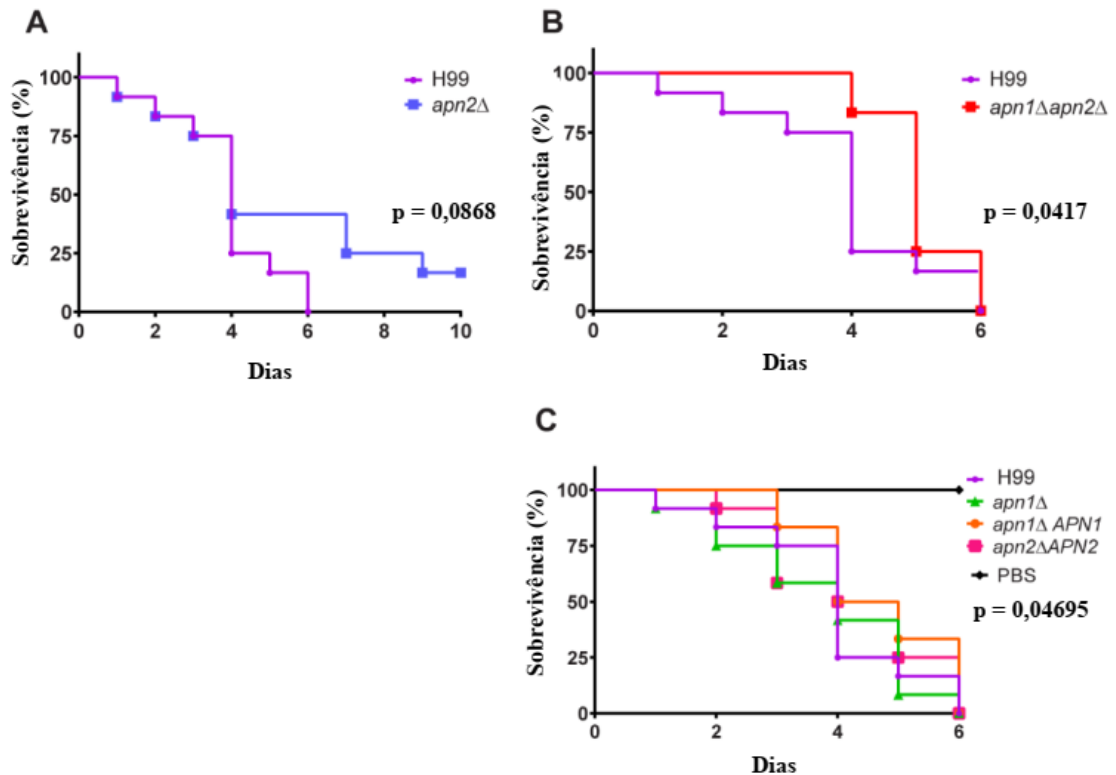


Figura 27. Avaliação da virulência de mutantes *apn* de *C. neoformans* usando modelo de infecção por *G. mellonella*. As larvas foram infectadas na última propata esquerda com 10 μ L de suspensão de células (total de 10^6) de cepas de *C. neoformans* (WT, *apn1* Δ , *apn2* Δ , *apn1* Δ *apn2* Δ mutantes) ou 10 μ L de PBS (controle). Após a infecção, as lagartas foram incubadas a 37 °C e monitoradas diariamente para avaliação da sobrevivência. **A)** Comparação entre curvas de sobrevivência de largartas infectadas com H99 e *apn2* Δ . **B)** Comparação entre as curvas de sobrevivência de lagartas infectadas com H99 e mutante *apn1* Δ *apn2* Δ . **C)** Curvas de sobrevivência das larvas infectadas com WT, *apn1* Δ , *apn2* Δ , *apn1* Δ *apn2* Δ e o Controle PBS. As curvas de sobrevivência foram analisadas usando o teste Log-rank (Mantel-Cox).

Os resultados observados em experimentos de *G. mellonella* corroboram os observados em ensaios em macrófagos. Legran e colaboradores avaliaram a participação da via BER na sobrevivência de *C. albicans* no interior dos macrófagos (M. Legrand et al. 2008). Os autores usaram cepas de *C. albicans* mutantes para vias de reparo de DNA para avaliar o papel da via BER na patogênese e determinar se existe uma relação entre a sobrevivência de *C. albicans* em macrófagos e o reparo de bases oxidadas no DNA. Como resultados, mutações nos genes *NTG1* e *APN1* não afetaram a sobrevivência das cepas após a fagocitose por macrófagos. Em *S. cerevisiae*, a interrupção de *NTG1*, *APN1* e *APN2* não induzem alterações na sobrevivência no interior de macrófagos (M. Legrand et al. 2008).

O envolvimento das proteínas de reparo de DNA em respostas celulares complexas, como vias associadas à interação com fagócitos, não era exatamente esperada. Santiago et al. (2015) realizaram uma triagem em biblioteca de mutantes de *C. neoformans* para

identificar genes envolvidos na resposta à internalização por macrófagos e demonstraram vários genes envolvidos na interação patógeno-hospedeiro que não eram necessariamente esperados (Santiago-Tirado et al. 2015). Um dos genes identificados foi o *APNI*, responsável por uma diminuição na internalização pelos macrófagos. No entanto, o mecanismo através dos quais os produtos gênicos individuais modulam as interações com os fagócitos do hospedeiro ainda é pouco compreendido.

Uma vez que nenhuma diferença significativa foi observada na produção de cápsula ou urease entre os mutantes *apn* de *C. neoformans*, é possível que outras características possam ser alteradas nesses mutantes para influenciar a internalização do fungo. Sugere-se, desta maneira, que a participação das proteínas Apn em outros mecanismos celulares, além do reparo do DNA, como ocorre para o homólogo mamífero APE1 (Evans, Limp-Foster, and Kelley 2000; Tell et al. 2009). O impacto causado pela ausência das proteínas Apn na sobrevivência do fungo dentro dos macrófagos pode estar associado, mesmo que em parte, ao atraso na produção de melanina, sensibilizando as células ao estresse oxidativo induzido pelo fagócito. Essa ideia também pode ser a razão para o ligeiro atraso na morte de *G. mellonella* por cepas mutantes *apn2Δ* e *apn1Δapn2Δ* (**Figura 27**), mas muito ainda precisa ser esclarecido.

6. Artigo de Dados

Article

Base Excision Repair AP-Endonucleases-Like Genes Modulate DNA Damage Response and Virulence of the Human Pathogen *Cryptococcus neoformans*

Rayssa Karla de Medeiros Oliveira ¹, Fabián Andrés Hurtado ¹, Pedro Henrique Gomes ¹, Luiza Lassi Puglia ¹, Fernanda Fonsêca Ferreira ², Kunal Ranjan ², Patrícia Albuquerque ³, Márcio José Poças-Fonseca ^{2,*†}, Ildinete Silva-Pereira ^{1,*†} and Larissa Fernandes ^{3,*†}

¹ Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, 70.910-900, Brazil; oliveirarkm@gmail.com (R.K.d.M.O.); fahejml@gmail.com (F.A.H.); pedro.hqgomes@gmail.com (P.H.G.); luiza_puglia@hotmail.com (L.L.P.)

² Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, 70.910-900, Brazil; fonseca.fernandaf@gmail.com (F.F.F.); kukkukr.ranjan@gmail.com (K.R.)

³ Faculty of Ceilândia, University of Brasília, Brasília, 72220-275, Brazil; palbuquerque@unb.br

* Correspondence: ildinetesp@gmail.com (I.S.-P.); mpossas@unb.br (M.J.P.-F.); larissaf@unb.br (L.F.)

† These authors share the senior authorship.

Citation: Oliveira, R.K.M.; Hurtado, F.A.; Gomes, P.H.; Puglia, L.L.; Ferreira, F.F.; Ranjan, K.; Albuquerque, P.; Poças-Fonseca, M.J.; Silva-Pereira, I.; Fernandes, L. Base Excision Repair AP-Endonucleases-Like Genes Modulate DNA Damage Response and Virulence of the Human Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *J. Fungi* **2021**, *6*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Received: 23 December 2020

Accepted: 5 February 2021

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible

Abstract: Pathogenic microbes are exposed to a number of potential DNA-damaging stimuli during interaction with the host immune system. Microbial survival in this situation depends on a fine balance between the maintenance of DNA integrity and the adaptability provided by mutations. In this study, we investigated the association of the DNA repair response with the virulence of *Cryptococcus neoformans*, a basidiomycete that causes life-threatening meningoencephalitis in immunocompromised individuals. We focused on the characterization of *C. neoformans* *APN1* and *APN2* putative genes, aiming to evaluate a possible role of the predicted Apurinic/aprimidinic (AP) endonucleases 1 and 2 of the base excision repair (BER) pathway on *C. neoformans* response to stress conditions and virulence. Our results demonstrated the involvement of the putative AP-endonucleases *Apn1* and *Apn2* in the cellular response to DNA damage induced by alkylation and by UV radiation, in melanin production, in tolerance to drugs and in virulence of *C. neoformans* in vivo. We also pointed out the potential use of DNA repair inhibitor methoxy-amine in combination with conventional antifungal drugs, for the development of new therapeutic approaches against this human fungal pathogen. This work provides new information about the DNA damage response of the highly important pathogenic fungus *C. neoformans*.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*; base excision repair; AP-endonucleases-like genes; *APN1* and *APN2*; virulence

1. Introduction

DNA integrity and genome stability are crucial for the adaptation and evolution of the species [1–3]. The ability of a pathogenic microorganism to survive in distinct environments, under different types of stresses, is usually related to phenotype plasticity. However, extreme alterations in the genome can compromise an organism's viability, so cells employ different mechanisms to preserve the genome from the mutagenic action of genotoxic agents and to ensure the correct chromosome duplication and transmission to the next generations. Molecular processes underlying genome stability include DNA damage sensors, DNA repair pathways and cell cycle checkpoints [2,4,5].

DNA repair is mediated by several proteins, in a complex system of signal cascades, DNA damage sensors and effector enzymes [4,6,7]. The base excision repair (BER) pathway is responsible for the recognition and correction of non-bulky DNA lesions such as oxidized bases and abasic sites (AP-sites) [8,9]. The BER pathway is essential to maintain cell integrity and the organism's survival under oxidative stress.

The BER pathway involves five steps to remove the DNA lesion and to restore DNA integrity: (i) excision of a damaged or inappropriate base by glycosylase proteins; (ii) incision of the phosphodiester backbone at the resulting abasic (AP) site by AP-endonucleases (APE); (iii) termini clean-up to permit unabated repair synthesis and/or nick ligation; (iv) gap-filling to replace the excised nucleotide by DNA polymerase; and (v) sealing of the remaining DNA nick by ligase [8,10]. In mammals, the disruption of APE proteins blocks the entire BER pathway [11].

Two major classes of AP-endonucleases have been characterized in *Escherichia coli*. The Xth family (exonuclease III) is constitutive and abundant, representing about 90% of the total AP activity. The Nfo (endonuclease IV) family represents 10–50% of the AP-endonuclease activity in the cells [12–14]. AP-endonucleases may act in functions beyond the AP-site cleavage. The most extensively studied AP-endonuclease proteins are human APE1 and APE2. APE1 possesses multifunctional activity, acting as a transcription factor and a redox activator [15]. Recently, it was demonstrated that APE1 and APE2 are involved in epigenetic and chromosomal alterations, facilitating the recruitment of the transcriptional machinery to specific promoters and enabling the formation of checkpoint protein complexes [16–18].

In *Saccharomyces cerevisiae* Apn1 is the major AP-endonuclease and belongs to the *E. coli* Nfo family. *S. cerevisiae* Apn2 shares homology with *E. coli* Xth and human APE1 and APE2 and has a back-up role in the repair of AP sites when Apn1 is absent [12,19]. Both possess APE and DNA 3'-phosphodiesterase activities [20]. Unlike *apn1*Δ mutants, *S. cerevisiae apn2*Δ mutants exhibit normal sensitivity to the alkylating agent methyl methane-sulfonate (MMS) and show no increase in spontaneous mutation rates, suggesting a less prominent role in the repair of AP sites [12,20,21]. Studies with *Candida albicans* revealed that Apn1 has minor participation in the susceptibility to DNA-damaging agents and drug response [22]. The function of *C. albicans* Apn1 is still unclear. In *Schizosaccharomyces pombe*, differently from *S. cerevisiae*, the Apn2

protein resolves approximately 90% of the abasic lesions on the BER pathway [23]. *S. pombe* Apn2 is phylogenetically closer to human APE proteins and possesses important domains involved in protein–protein interactions [23,24].

The mechanisms involved in the cellular response to DNA damage and repair are of great clinical significance [25–29]. DNA damage-inducing drugs, such as cisplatin and temozolomide and DNA repair inhibitor drugs, such as methoxy-amine, are used in cancer therapy [30–32]. Several antibiotic drugs are known to cause chemical damage to DNA. Drugs from the bleomycin family bind to DNA and induce double-strand breaks [33]. Antifungal drugs, like polyenes, induce the production of reactive oxygen species (ROS) [34]. Antimicrobial-induced ROS, such as hydroxyl radicals, damage the DNA through the formation of abasic sites, DNA strand breaks, and the incorporation of oxidized guanine residues into the genome [33,35].

DNA damage and repair are also involved in microbial virulence. Mutations are involved in the microevolution of several pathogens, while pathogenic microbes have developed several mechanisms to prevent DNA damage, which can be induced, for example, by reactive oxygen, nitrogen, and chloride species during host response to infection [36–39]. *C. neoformans*, the etiological agent of cryptococcosis, is the major cause of illness in people living with HIV/AIDS worldwide [40,41]. This ubiquitous basidiomycete is highly adapted to extreme environmental conditions such as desiccation, high temperatures and UV exposure [41,42]. Considering both environmental and host-related processes that might induce DNA damage in *C. neoformans* cells, we decided to investigate the involvement of the BER pathway in stress resistance and virulence in this fungal pathogen by the functional characterization of the BER pathway putative genes encoding Ap-endonucleases 1 and 2.

2. Materials and Methods

2.1. Strain Maintenance

The *C. neoformans* serotype A strain H99 (kindly donated by Prof. J. Andrew Alspaugh, Duke University, Durham, NC, USA) was used to generate *apn1*Δ, *apn2*Δ, the double *apn1*Δ*apn2*Δ mutants and the complemented strains. All the strains were stored in 35% glycerol at –80 °C. Yeasts were cultured on YPD (Yeast extract – Peptone – Dextrose) agar plates (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose and 1.5% agar pH 5.6) and incubated at 30 °C, unless stated otherwise. Single colonies were inoculated in liquid YPD and grown overnight at 30 °C, under agitation (150 rpm). Before the experiments, cells were centrifuged at 4000 rpm and washed in phosphate-buffered saline (PBS) 1× to remove the culture medium.

2.2. Phylogenetic Analysis of the Predicted *C. neoformans* *Apn1* and *Apn2* Proteins

The amino acid sequences of previously identified AP-endonucleases of *S. cerevisiae* (ASP85051.1), *S. pombe* (NP_595522.1), *C. albicans* (KHC89247.1), and *Homo sapiens* (AAD43041.1) were obtained from the Broad Institute Fungal Genome Initiative (<https://www.broadinstitute.org/fungal-genome-initiative>), FungiDB (<http://fungidb.org/fungidb/>) and the NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) data base (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). All of the sites were accessed on 5 November 2014. These sequences were compared with the genome of *C. neoformans* var *grubii* H99 by using the Blastp tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). Multiple sequence alignments were performed by MUSCLE 3.7 (Multiple Sequence Comparison by Log expectation): http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/simple_phylogeny.cgi Task_type = muscle. From the comparison with the *S. cerevisiae*, *C. albicans* and *S. pombe*, CNAG_05468 and CNAG_04268 were assumed to correspond to the *C. neoformans* AP endonuclease 1 (*Apn1*) and *Apn* exodeoxyribonuclease III (*Apn2*) putative coding sequences, respectively.

2.3. Disruption of the *APN1*- and *APN2*-Like Genes

The *C. neoformans* *APN1* and *APN2* putative genes were deleted from the serotype A H99 strain background by biolistic transformation and homologous recombination of the deletion cassette. The double-joint PCR (DJ-PCR) strategy [43] was used to construct the deletion cassettes. The first round of the DJ-PCR method was performed with primer pairs to amplify the 5'- and 3'-flanking regions of the target genes, using the H99 strain genomic DNA as a template. The dominant selection markers for Nourseotricin (NATr) and Hygromycin B (HYGr) were amplified with the M13Fe (M13 forward extended) and M13Re (M13 reverse extended) primers from the pPZPNAT and pPZPHYG73 plasmids, respectively. In the second round of PCR, the first-round amplicons were used as a template for the amplification of the target gene disruption cassettes with the 5' or 3' region of the NAT-split or HYG-split marker. The split gene disruption cassettes were introduced into the H99 strain by using the biolistic transformation

method [43]. Stable Nourseothricin- or Hygromycin B- resistant transformants were screened by colony PCR with the primer sets listed in Table S1. The genotypes of all the positive transformants were verified by PCR analysis (Figure S1) and described in Table S2.

2.4. Phenotype Assays

For resistance to stress conditions, serial dilutions of cell suspensions (10^6 to 10^2 cells) were plated on YPD agar supplemented with 0.03 mM menadione (MND), 4 mg/mL sodium nitrite (NaNO_2), 1 or 3 mM hydrogen peroxide (H_2O_2), 1.5 M sodium chloride (NaCl), 1.5 M potassium chloride (KCl), 32.4 mg/mL calcium sulfate (CaSO_4), 110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hydroxyurea (HU), 0.03% ethyl methane-sulfonate (EMS), 2.5 M sorbitol, 0.03% methyl methane-sulfonate (MMS), and 0.5 or 1 mg/mL caffeine. Plates were incubated at 30 or 37 °C for 48 h. For the capsule expansion measurement, cells were inoculated into chemically defined minimal medium (15 mM dextrose, 10 mM MgSO_4 , 29.4 mM KH_2PO_4 , 13 mM glycine, 3 μM thiamine (pH 5.5)), incubated at 30 °C, at 150 rpm, for 2 days and counterstained with India ink. The diameter of each cell body and surrounding capsule was measured by ImageJ (Fiji) software. The average diameter of the capsule was calculated by subtracting the cell body diameter from the whole cell diameter (cell body + capsule). At least 100 cells were measured for each assay.

For the analyses of phospholipase or urease activities, 10^6 cells were spotted on Agar Egg emulsion medium or on Christensen's urea agar (0.1% peptone, 0.5% NaCl, 0.2% KH_2PO_4 , 0.1% glucose, 2% urea, 0.0016% phenol red), respectively, and incubated for 72 h at 30 °C. Phospholipase activity (Pz) was measured by the ratio of the colony diameter (DC) to the colony diameter plus precipitation zone (DCP). $\text{Pz} = 1 =$ no activity; $1 > \text{Pz} > 0.63 =$ phospholipase activity [44]. Urease activity was analyzed by the change from yellow to pink of Christensen's urea medium color.

For the melanin production assay, cells were inoculated in liquid minimal medium supplemented with 1 mM L-DOPA (l-3,4-dihydroxyphenylalanine) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubated at 30 or 37 °C, with shaking at 150 rpm, for 4 days in dark. All the assays were performed as three independent experiments.

2.5. Growth Curve Analysis

Cell suspensions were adjusted to the concentration of 1×10^5 /mL in YPD medium. In a 96-well polystyrene microplate, 1×10^4 cells/well were inoculated and the plates were incubated under continuous agitation at 30 or 37 °C. Optical density was measured every 30 min at 600 nm by the Eon biotek spectrophotometer (BioTek Eon Microplate Spectrophotometers, Winooski, VT, United States) for 96 h. All the assays were performed as three independent experiments.

2.6. Evaluation of the Yeast Cells' Resistance to Genotoxic Stress

For the UV irradiation susceptibility analysis, serial dilutions of cell suspensions were spotted on YPD agar plates and exposed to UV irradiation of 60 to 480 J/m^2 at 254 nm in a UV cross-linker

chamber UVP CX-2000 (Fisher Scientific, Leicestershire, UK). The plates were incubated at 30 °C for 2 days and photo-documented. For viability analyses, 5×10^2 cells were washed, plated on YPD plates and exposed to 120, 240 or 480 J/m² at 254 nm in a UV cross-linker chamber. Plates were protected from light and incubated at 30 °C for 2 days for colony-forming unit (CFU) counting. Yeast cells were spotted onto YPD agar containing the DNA damage stress-inducing agents: HU (110 mM), MMS (0.03%), EMS (0.04%), *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) (200 µg/mL), ethidium bromide solution (EtBr) (20 µg/mL).

For cell viability analyses, yeasts were inoculated in liquid YPD containing MMS (0.1% or 0.2%), EMS (0.1% or 0.2%), methoxyamine (MX) (0.417 mg/mL to 1.67 mg/mL), or Zeocin (0.4% to 0.16%) and incubated for 1 h, at 30 or 37 °C, at 200 rpm. Five hundred cells were washed, plated on YPD plates and incubated at 30 °C for 2 days for CFU counting. The assay was performed as three independent experiments. Statistical test One-way ANOVA with Dunnett's post-test was applied, to compare the results.

For the evaluation of DNA fragmentation, 5×10^7 cells of the *C. neoformans* strains were exposed to 0.08% Zeocin for 1 h in YPD liquid medium at 30 °C at 200 rpm. Cells were washed with PBS, and DNA was extracted using the Smash and Grab protocol. One µg of genomic DNA was loaded in 1.5% agarose gel stained with 0.5 µg/mL EtBr. Genomic DNA from the unexposed H99 strain was used as control. The pattern of DNA migration on agarose gel was compared to genomic DNA of unexposed H99 to define the presence of DNA trail and fragmentation. The assay was performed as three independent experiments.

For the evaluation of the combined action of MX and H₂O₂, 1×10^6 cells/mL were cultured in YPD medium containing 0.417 mg/mL MX combined with 3 mM or 5 mM H₂O₂, for 1 h, at 30 °C and 150 rpm. Cells grown in YPD containing only 1 mM or 5 mM H₂O₂ were used as control. Cell viability was assessed by CFU counting. Results were represented in graphs as the ratio of cells exposed to MX + H₂O₂ normalized to the cells exposed to H₂O₂. For the survival analysis, cells of the WT and mutant strains were incubated in liquid YPD medium for 1 h, at 30 °C, and 150 rpm in the absence (control) or in the presence of MX (0, 0.417, 0.834 or 1.67 mg/mL). Cells were then PBS-washed and the number of CFUs was assessed. For the analysis of virulence factors after MX exposure, cells from each strain were incubated with 0.417 mg/mL MX for 1 h, at 37 °C, PBS-washed, diluted and inoculated for melanin production and urease activity analyses. Visual detection was performed daily and documented after 72, 96 and 144 h of growth. The assay was performed as three independent experiments.

2.7. MIC Determination Assays

A stock solution of each antifungal agent was prepared as recommended by the NCCLS M27-A3 protocol. The following ranges were tested: Amphotericin B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.125 to 16 µg/mL; Fluconazole (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.008 to 64 µg/mL. methoxy-amine was tested in the range of 0.125 to 16 mg/mL. One hundred µL of each chemical agent, diluted in RMPI medium, at a two-fold concentration, was

placed in duplicate wells of sterile 96-well plates (Corning Glass Works, Corning, NY, USA).

An aliquot of 5×10^4 yeast cells/mL in RPMI medium was added to the wells containing the drugs. Plates were then incubated at 37 °C, protected from light. End-points were macroscopically checked after 72 h. MIC (minimum inhibitory concentration) was defined as the lowest concentration at which there was a visually complete inhibition of growth compared to controls. The assay was performed as three independent experiments.

2.8. Evaluation of Drug Interactions

The interaction of amphotericin B (AmpB) with methoxyamine hydrochloride (MX) was evaluated by the microdilution checkerboard method employing the H99, *apn1Δ*, *apn2Δ* and *apn1Δapn2Δ* strains [45]. The drug concentrations varied from five-fold dilutions below to four-fold above the estimated MIC. Fifty μ L of each drug, AmpB and MX, at a two-fold concentration in RPMI medium were added to 96-well plates.

All the strains were grown in YPD broth and incubated for 20 h at 30 °C with shaking. Cells were washed with 1 \times PBS and the inoculum concentration was adjusted to 1×10^5 cells mL⁻¹. One hundred μ L of this solution was added to the wells containing 50 μ L of both drugs at the 2 \times concentration. Positive controls without drugs and negative controls without yeast cells were performed. Plates were protected from light and incubated at 37 °C. After 72 h of incubation, endpoint cultures were visually read. Tests were performed in two biological replicates.

Cell proliferation was evaluated and fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated as previously described by Pfaller et al., (2015) [45]. FICI was calculated by the equation: $FICI = (MIC_a \text{ in combination} / MIC_a \text{ tested alone}) + (MIC_b \text{ in combination} / MIC_b \text{ tested alone})$; MIC_a: AmpB and MIC_b: MX. The result of the FICI was interpreted as follows: ≤ 0.5 -synergy, >0.5 and ≤ 4.0 -indifferent, >4.0 -antagonism [45].

2.9. In Vitro Phagocytosis Assays

2.9.1. Ethics Statement

All the animal procedures were performed in accordance with national and institutional guidelines for animal care and were approved by the University of Brasilia (UnB) Committee of Ethical Use of Animals (Proc. UnB Doc 52657/2011).

2.9.2. Infection of Bone Marrow-Derived Macrophages

Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were obtained as previously described [46], by extracting the bone marrow from femurs and tibiae of C57BL/6 mice 8 to 12 weeks old (Animal Facility of the Institute of Biological Sciences of the University of Brasilia). Cells were cultured in vitro on non-treated 100 mm Petri dishes in complete RPMI 1640 medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 50 μ g/mL of gentamicin, 50 μ M 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 20 ng/mL recombinant GM-CSF (PeproTech;

Ribeirão Preto, SP, Brazil). The cultures were incubated for 8 days at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. On day 3, 10 mL of fresh complete medium was added to the culture. Half of the medium volume was substituted on day 6. On day 8, BMDMs were detached from plates with TrypLE™ Express (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and collected.

2.9.3. Phagocytosis Assay

Approximately 5×10^4 BMDMs were plated onto each well of 96-well polystyrene microplates with 100 μ L of RPMI medium supplemented with 10% FBS. The cultures were incubated for 24 h at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. The supernatant was removed and 2.5×10^5 yeast cells of *C. neoformans* (Multiplicity of Infection; MOI = 5) were added to each well in 100 μ L of RPMI medium supplemented with 10% FBS and the 18B7 mAb (kindly donated by Dr. Arturo Casadevall, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA) at 10 μ g/mL. The co-cultures of *C. neoformans* strains with macrophages were then incubated for 2 or 24 h post-infection (hpi) at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After 2 h of interaction, non-internalized yeast cells were removed by rinsing the wells with PBS. For the 24 h assays, fresh pre-warmed RPMI medium with 10% FBS was added to the wells.

For the quantitation of phagocytosis, cells were fixed and stained with Fast Panoptic kit (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil). Under the Axio Observer Primovert GmbH microscope (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany), 200 macrophages per well were observed for the determination of the percentage of phagocytosis (percentage of macrophages that have phagocytized one or more yeasts relative to the total number of cells counted) and the phagocytic index (the average number of phagocytized yeast cells per BMDM).

To determine the ability of the *C. neoformans* strains to proliferate inside BMDMs, colony-forming unit (CFU) assays were performed after 2 or 24 h of co-culture. After the incubation periods, yeast cells were released by lysing the macrophages with 0.05% SDS (Sodium dodecyl sulfate). For the 24 h assay, the supernatant and lysate were pooled. The number of CFUs was determined by serial dilution of each sample plated on YPD agar incubated at 30 °C and counted after 48 h. The phagocytic activity, defined as the number of CFUs obtained from a well at the two-hour time point, and intracellular growth, defined as the number of CFUs from the 24 h time point, were determined.

Three independent experiments were performed in technical triplicate. The multiple group comparisons were conducted by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-test. For the comparison of proportions, the Chi-square test was performed with a *p*-value <0.05.

2.10. Wax Moth Larvae Infection

G. mellonella infection was performed as previously described by Garcíá-Rodas et al. [47]. Briefly, 16 randomly collected *G. mellonella* larvae were inoculated with 10 μ L of a 10^6 yeast cells/mL suspension by injection in the last left pro-leg using a sterile 26-gauge needle-fitted Hamilton syringe. *G. mellonella* larvae were

inoculated with 1× PBS as control for the physical injury. Larval survival was daily evaluated for 7 days. Larval death was defined by the absence of movement in response to touch.

2.11. Statistical Analyses

Data are presented as the mean ± standard deviation (SD) unless otherwise stated. The statistical analysis was performed using software GraphPad Prism version 6.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com). The appropriate test is indicated for each experiment. *p* values ≤0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. *Apn2*-Like *C. neoformans* is an *ExoIII/Ape1* Member of the AP Endonucleases Family

The nucleotide sequences of *S. cerevisiae* ScApn1 (NCBI ID 853746) and ScApn2 (NCBI ID 852262) were used as queries for the NCBI BLASTp search against six-frame translations of the *C. neoformans* sequence database. The sequences CNAG_05468 and CNAG_04268 of the *C. neoformans* genome presented the highest identity with ScApn1 and ScApn2 sequences, respectively. *C. neoformans* Apn1 (CnApn1) predicted protein contains 483 amino acid residues, compared to 719 aa of the putative CnApn2 protein. Both deduced sequences share only 22.51% identity. The predicted CnApn1 protein presents two discrete domains: a xylose isomerase-like domain (position 138), and an nfo-apurinic endonuclease domain (endonuclease IV-like protein; position 428). The CnApn1 putative protein presents 48.3% identity with the Apn1 of *S. pombe*, 45.8% with the *E. coli* Endonuclease IV, 43.9% with the Apn1 of *C. albicans* and 42.4% identity with the *S. cerevisiae* Apn1 (Figure 1A).

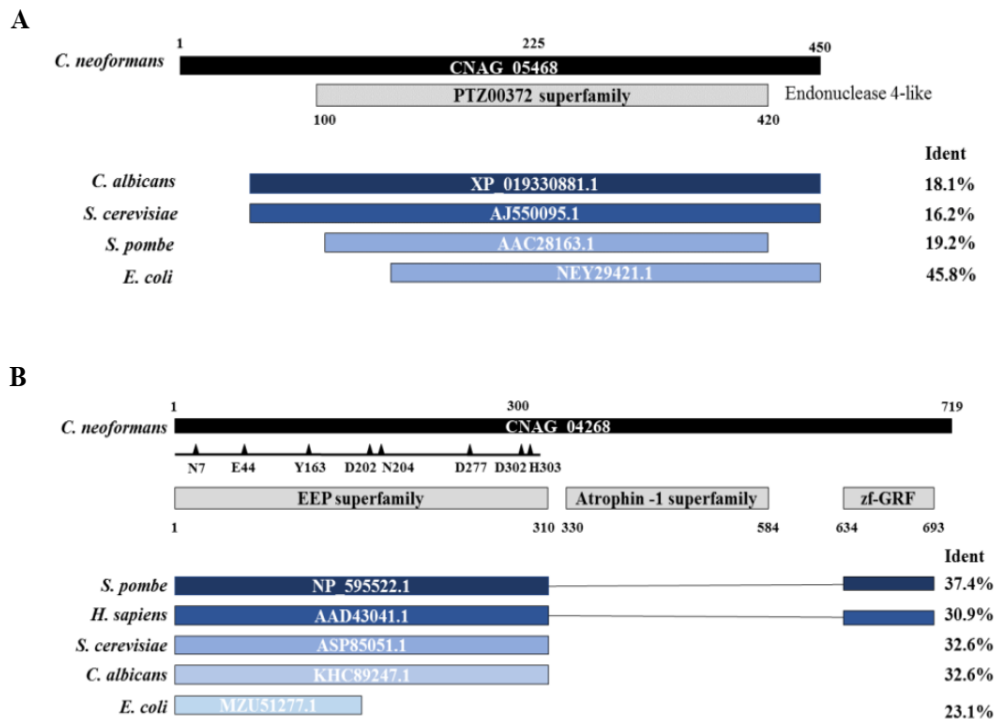


Figure 1. Comparative analysis of Apn deduced amino acid sequences. *APN1*-like (CNAG_05468) and *APN2*-like (CNAG_04268) gene sequences from *C. neoformans* were used as query for Blastp analyses. (A) Alignment results of Apn1 amino acid sequences from *C. albicans*, *S. pombe*, *S. cerevisiae* and *E. coli*, highlighting the cover and identity with the *C. neoformans* Apn1-like amino acid sequence. (B) Alignment results of Apn2 sequences from *S. pombe*, *H. sapiens*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* and *E. coli*, highlighting the cover and identity with the *C. neoformans* Apn2-like deduced amino acid sequences. NCBI accession numbers are depicted in each protein representation. Triangles represent key-amino acids for the catalytic sites; Ident: percentage of amino acid identity provided by Blastp analysis on NCBI. EEP: exonuclease-endonuclease-phosphatase. zf-GRF: zinc finger domain.

The sequence CNAG_04268, encoding a putative exodeoxyribonuclease III, was defined as the putative Apn2 of *C. neoformans*, and used as a query for BLASTp analyses on NCBI against the genomes of *S. pombe*, *Homo sapiens*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, and *E. coli* (Figure 1B). The predicted *C. neoformans* Apn2 shares several conserved and essential amino acid residues with *S. pombe* Apn2, human APE2 and *S. cerevisiae* Apn2.

The N-terminal region of the Apn2-like protein contains an Exonuclease–Endonuclease–Phosphatase (EEP) superfamily domain, conserved in all the analyzed species. This large superfamily includes the catalytic domain of a diverse set of proteins, including the ExoIII family of AP endonucleases [48]. In contrast to the Apn proteins from other organisms, the putative *C. neoformans* Apn2 presents an Atrophin-1 domain. Atrophin proteins are conserved transcriptional corepressors involved in nuclear receptor signaling [49]. About 250 amino acid residues, corresponding to the atrophin-1 superfamily domain of Apn2, are missing in the Apn1-like protein (Figure 1A).

3.2. *apn1*Δ, *apn2*Δ and *apn1*Δ*apn2*Δ Mutant Strains Do Not Differ from the Parental Strain Regarding Osmotic or Oxidative Stress Sensitivity

AP-endonucleases knockout mutants were generated by homologous recombination after biolistic transformation of the H99 strain. To confirm the precise replacement of the *APN1* and *APN2* loci with the selective marker, multiple combinations of PCR primers were used (Figure S1A,B). The double mutant *apn1*Δ*apn2*Δ strain was also obtained. In order to verify if eventual phenotype alterations were indeed due to the deletion of the DNA sequences, *APN1* and *APN2* putative genes were reintroduced into the mutant strain's genome, to create the reconstituted strains. The reintroduction of the sequences into the mutant strains genomes was confirmed by PCR (Figure S1A,B).

Initially, we evaluated if the putative *APN1* and *APN2* genes affected growth or viability of *C. neoformans* yeast cells. We observed no effect of the single or the double deletions on the growth in solid YPD or on their growth kinetics in liquid YPD broth at 30 or at 37 °C in comparison to the WT strain (Figures S2 and S3). To evaluate the potential role of *APN*-like genes for *C. neoformans* survival under stress conditions, *apn1*Δ, *apn2*Δ and the *apn1*Δ*apn2*Δ double mutant strains were tested for stress-related phenotypes. Overall, disruption of *APN1*, *APN2* or of both genes simultaneously induced mild defective phenotypes in response to cell surface stressors (sodium dodecyl sulfate, Sorbitol, caffeine), but none of the genotoxic (Cadmium sulfate (CaSO₄) or osmotic (sodium chloride (NaCl) potassium chloride (KCl)) stressors, at the tested concentrations, affected the growth of the *C. neoformans* mutant strains at 30 or 37 °C (Figure S2A,B). Additionally, we did not observe any significant difference in the mutant's response to oxidative stress induced by menadione (MND), sodium nitrite (NaNO₂) or hydrogen peroxide (H₂O₂) (Figure S4). These data demonstrate that the putative *APN1* and *APN2* sequences are not essential for growth or response of *C. neoformans* to those stressors.

3.3. *C. neoformans* *APN1* and *APN2*-Like Genes Are Involved in the Repair of DNA Radiation-Induced Lesions

To assess if the CnApn1 and CnApn2 predicted proteins participate in the repair of radiation-derived DNA lesions, WT and mutant strains were exposed to different UV radiation dosages, and the viability of fungal cells was evaluated. Disruption of *APN1* and *APN2*-like sequences resulted in increased susceptibility of *C. neoformans* to UV radiation (Figure 2). Deletion of both the *APN*-like genes induced a higher sensitivity to UV radiation when compared to the single mutant strains' phenotypes (Figure 2A). The susceptibility of the strains to UV radiation was also investigated by plating on YPD agar a defined number of cells after irradiation with 120, 240 and 480 J/m² at 254 nm. Yeasts' viability was estimated by CFU counting, and the results indicated that the disruption of *APN2* significantly affected the *C. neoformans* survival in a radiation dose-dependent manner (Figure 2B). Even though moderate resistance to UV radiation was observed for the *apn1*Δ strain when compared to the WT, the double deletion of *APN1* and *APN2*

promoted an even higher sensitivity to UV radiation than the *APN2* single mutation (Figure 2B).

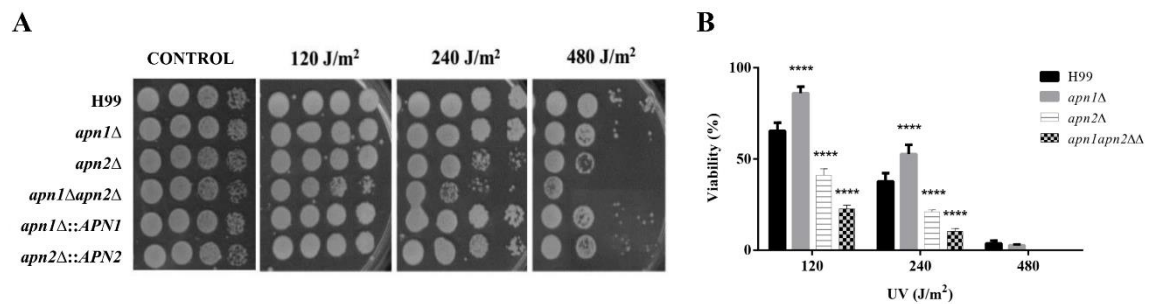


Figure 2. Disruption of *Apn1*- and *Apn2*-like genes induced *C. neoformans* susceptibility to UV radiation. (A) Ten-fold serial dilutions of *C. neoformans* WT, mutant and reconstituted strains of yeasts were exposed to 120, 240 and 480 J/m² doses of UV radiation (254 nm) and grown at 30 °C, for 48 h. The results are representative of at least three independent experiments. (B) Cell viability (%) after UV irradiation. *C. neoformans* 5 × 10² cells were plated on YPD agar and exposed to UV radiation at 120, 240 and 480 J/m² at 254 nm. The plates were incubated at 30 °C for 48 h, protected from light, for colony forming unit (CFU) counting. Graph represents the percentage of viable cells normalized by the percentage of viable control cells. The WT H99 strain was used as control for statistical comparison. One-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's post-test was used to compare the means of results from three independent experiments. Error bars represent standard errors of the mean. **** *p* < 0.0001.

3.4. The Putative *Apn2* Endonuclease Is Involved in Processing Alkylation-Induced DNA Damage in *C. neoformans*

In order to evaluate the possible roles of CnApn1 and CnApn2 predicted proteins in the repair of different types of DNA lesions, the growth of the mutant strains was evaluated after their exposure to different mutagenic agents. Neither the single mutant (*apn1*Δ and *apn2*Δ) nor the double mutant (*apn1*Δ*apn2*Δ) strains displayed any growth difference in comparison to the WT strain after exposure to hydroxyurea (HU, 110mM), the alkylating compounds methyl methane-sulfonate (MMS, 0.03%), ethyl methane-sulfonate (EMS, 0.04%) and N-ethyl-N-nitrosourea (ENU, 200 μg/mL), or the intercalating agent ethidium bromide (EtBr, 20 μg/mL) (Figure 3A).

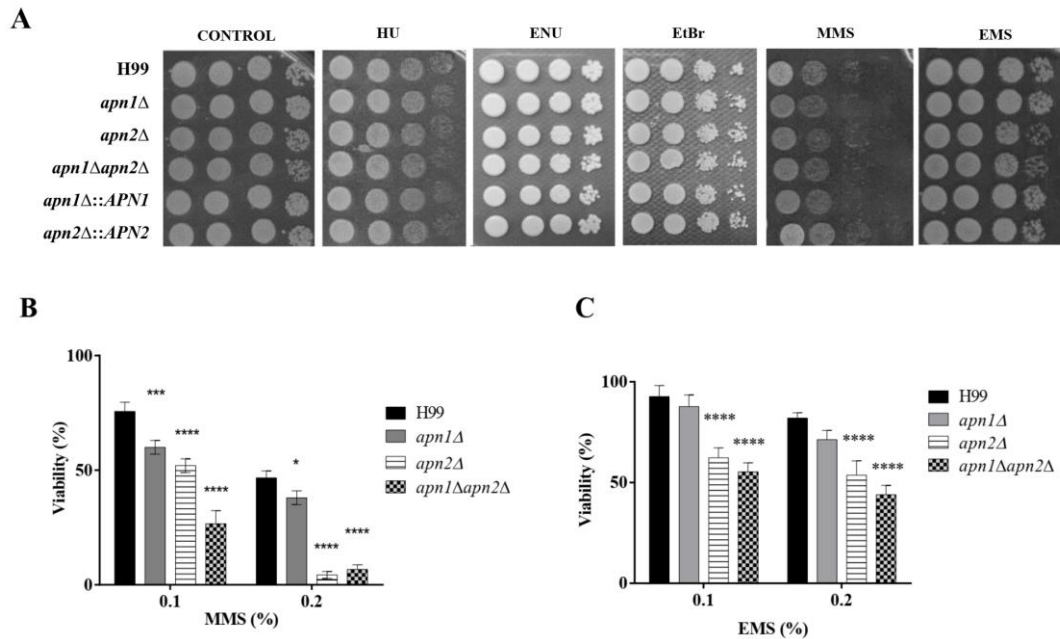


Figure 3. Predicted Apn2 endonuclease is required for yeast viability after exposure to DNA-alkylating agents. **(A)** The different strains were serially diluted ten-fold and plated onto YPD agar supplemented with DNA damage-inducing agents: 0.03% methyl methane-sulfonate (MMS), 0.04% ethyl methane-sulfonate (EMS), 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethidium bromide (EtBr) or 110 mM hydroxyurea (HU). The plates were incubated at 30 $^{\circ}\text{C}$ for 48 h. The results are representative of three independent experiments. **(B)** Cell viability after exposure to 0.1 or 0.2% MMS or **(C)** 0.1 or 0.2% EMS. The strains were exposed to the agents in liquid YPD for 1 h, at 30 $^{\circ}\text{C}$ and 150 rpm. Cells were then phosphate-buffer saline- (PBS)-washed and plated on YPD agar for CFU counting. The graphs represent the percentage of viable cells normalized by the percentage of viable control cells. The WT H99 strain was used as control for statistical comparison. One-way ANOVA with Dunnett’s multiple-comparisons test was used to compare the means of results from three independent experiments. Error bars represent standard errors of the mean. **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$.

We further submitted the mutants to higher concentrations of MMS and/or EMS (0.1% or 0.2%) for 1h, at 30 $^{\circ}\text{C}$, followed by CFU counting to access yeasts’ viability (Figure 3B). Cells from the *apn1Δ* single mutant were only sensitive to MMS-induced stress at both tested concentrations. At 0.2% MMS, the survival of *C. neoformans apn2Δ* was drastically reduced to less than 10% in comparison to the wild-type cells (75% survival). Treatment with EMS also promoted, to a lesser extent than MMS, a reduced viability of the *apn2Δ* mutant in relation to the WT strain. In comparison to the wild-type and single-gene deletion strains, the *apn1Δapn2Δ* double mutant was more sensitive to higher concentrations of MMS and EMS. These results indicate a major involvement of CnApn2 in the response to MMS and EMS-induced alkylated DNA.

3.5. The Deletion of APN-Like Genes Results in Increased Sensitivity to Zeocin and DNA Fragmentation

Zeocin is a genotoxic drug that intercalates into the DNA, provoking double-strand breaks [50]. To evaluate the influence of the predicted Apn proteins in the response of *C. neoformans* to Zeocin, the mutant and WT strains were exposed to different

concentrations of the drug, for 1h. The deletion of *APN1* and *APN2* resulted in increased sensitivity to Zeocin even in low doses (0.04% or 0.08%) (Figure 4A).

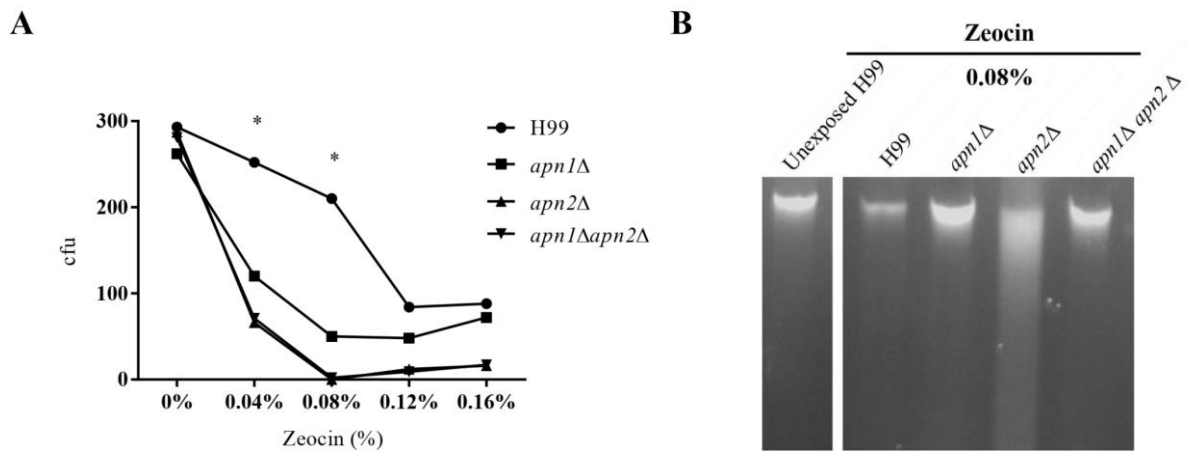


Figure 4. The ablation of the predicted Apn1 and Apn2 proteins sensitized *C. neoformans* yeasts to the exposure to Zeocin. (A) Cell viability of the WT and mutant strains after incubation with different concentrations of Zeocin. Yeasts from WT and mutant strains were cultured in liquid YPD containing 0.04%, 0.08%, 0.12% or 0.16% Zeocin for 1 h, at 30 °C, 150 rpm. Cells were then PBS-washed and plated on YPD agar for CFU counting. Percent of viable cells was calculated from the CFU counting. Data are presented as mean of three replicates. Statistical test: One-way ANOVA with Dunnett's post-test, * $p < 0.05$. (B) Electrophoretic analysis in 1% agarose gel stained with 0.5 $\mu\text{g/mL}$ EtBr of *C. neoformans* strains DNA after exposure to 0.08% Zeocin for 1 h. Unexposed mutant and H99 strains presented DNA with no fragmentation. Genomic DNA from the unexposed H99 strain was used as control. The result is representative of three independent experiments.

To investigate the possible contribution of the putative AP-endonucleases in the protection of *C. neoformans* DNA from the damage provoked by Zeocin, we qualitatively analyzed the DNA fragmentation in the WT, *apn1*Δ, *apn2*Δ and *apn1*Δ*apn2*Δ mutant strains. Unexposed and (0 h) control cells showed almost undetectable levels of DNA fragmentation (Figure 4B). Nonetheless, DNA smearing was observed after 1 h of exposure to 0.08% Zeocin for all the strains (Figure 4B). The *apn2*Δ mutant displayed a marked increase in Zeocin-induced DNA fragmentation in comparison to the WT (Figure 4B). The increase in DNA fragmentation in *apn2*Δ suggests a reduced DNA repair capability.

3.6. The Inhibition of Recognition of Abasic Sites By Methoxy-amine Enhances the Fungicidal Effect of Amphotericin B

Amphotericin B (AmpB) generation of reactive oxygen species contributes to the fungicidal effect of this drug [49]. We then decided to evaluate whether compounds that inhibit the corrections of oxidative lesions, such as the anti-cancer chemotherapeutic drug methoxy-amine (MX), could increase the antifungal effect of AmpB. We first determined the MIC values for MX, AmpB and Fluconazole alone for each strain (Table 1). The mutant strains *apn2*Δ and *apn1*Δ*apn2*Δ presented MIC values of 1.0 $\mu\text{g/mL}$ of Fluconazole, half of the MIC values presented by the H99, *apn1*Δ

and reconstituted strains (2.0 µg/mL). Based on these values, we used different combinations of the MX and AmpB drugs for a checkerboard assay, to evaluate a possible drug interaction. The combination of AmpB and MX showed synergism against all the strains. The combination of these drugs was more effective against the *apn2Δ* (FICI = 0.187) and *apn1Δapn2Δ* (FICI = 0.219) strains than for H99 (FICI = 0.375) and *apn1Δ* (FICI = 0.312) (Table 2).

Table 1. MIC values of amphotericin B (AmpB), methoxy-amine hydrochloride (MX) and Fluconazole (Flu) against H99, *apn1Δ*, *apn2Δ* and *apn1Δapn2Δ* and reconstituted strains.

| Strains | Replicate 1 | | | Replicate 2 | | |
|--------------------|-----------------|---------------|----------------|-----------------|---------------|----------------|
| | AmpB (µg/mL) | MX (mg/mL) | Flu (µg/mL) | AmpB (µg/mL) | MX (mg/mL) | Flu (µg/mL) |
| H99 | 0.25 | 1.25 | 2 | 0.25 | 1.25 | 2 |
| <i>apn1Δ</i> | 0.25 | 1.25 | 2 | 0.25 | 1.25 | 2 |
| <i>apn2Δ</i> | 0.125 | 0.626 | 1 | 0.125 | 0.626 | 1 |
| <i>apn1Δapn2Δ</i> | 0.125 | 0.626 | 1 | 0.125 | 0.626 | 1 |
| <i>apn1Δ::APN1</i> | 0.25 | 1.25 | 2 | 0.25 | 1.25 | 2 |
| <i>apn2Δ::APN2</i> | 0.25 | 1.25 | 2 | 0.25 | 1.25 | 2 |

Table 2. MIC values of amphotericin B (AmpB) and methoxy-amine hydrochloride (MX) in combinations and fractional inhibitory concentration index (FICI) values.

| Strains | Replicate 1 | | | Replicate 2 | | |
|-------------------|-------------|-------|--------|-------------|-------|--------|
| | MICab | MICba | FICI | MICab | MICba | FICI |
| H99 | 0.0625 | 0.292 | 0.50 | 0.0312 | 0.150 | 0.2498 |
| <i>apn1Δ</i> | 0.0156 | 0.292 | 0.3124 | 0.0625 | 0.078 | 0.3125 |
| <i>apn2Δ</i> | 0.0078 | 0.078 | 0.1874 | 0.0078 | 0.078 | 0.1874 |
| <i>apn1Δapn2Δ</i> | 0.0156 | 0.078 | 0.2498 | 0.0078 | 0.078 | 0.1874 |

MICab: MIC of AmpB in combination with MX. MICba: MIC of MX in combination with AmpB. The AmpB concentrations are expressed in µg/mL, and for MX in mg/mL.

Since MX inhibits the recognition and correction of abasic sites by AP-endonucleases, we investigated the effect of MX exposure in combination with H₂O₂-induced oxidative stress in WT and APN-like genes' mutant strains (Figure 5). The strains were exposed to 3 mM or 5 mM H₂O₂ in combination with 0.417 mg/mL MX, for 1 h, at 30 °C and 150 rpm. Yeasts' viability was assessed by CFU counting. The exposure to 3 mM H₂O₂ combined with MX provoked a significant decrease in cell viability for the *apn1Δ* and the *apn1Δapn2Δ* mutant strains (Figure 5B), but not *apn2Δ*. After exposure to 5mM H₂O₂ and MX, there was a marked reduction of CFU recovery for all the strains.

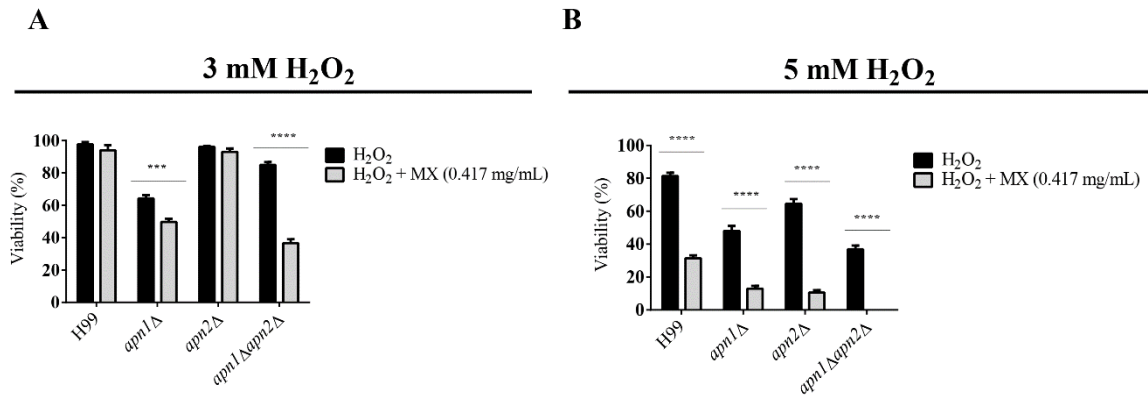


Figure 5. Methoxy-amine (MX) enhances the effects of H₂O₂ on the viability of the *C. neoformans* *apn1*Δ*apn2*Δ mutant strain yeasts. Cell survival of *C. neoformans* WT and mutant strains for the combined exposure to MX and H₂O₂. Strains were cultured in liquid YPD containing 0.417 mg/mL MX and (A) 3 or (B) 5 mM H₂O₂, for 1 h, at 30 °C and 150 rpm. Cells incubated only in YPD containing 3 or 5 mM H₂O₂ were used as comparison. The graph represents the percent of survival of each strain exposed to each condition described compared to the control condition (YPD medium). Two-way ANOVA with Sidak's multiple-comparisons test was used to compare the means of results from three independent experiments. Error bars represent standard errors of the mean. **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$.

3.7. The CnApn1 and CnApn2-Like Sequences Are Required for the Production of Melanin

We also evaluated the involvement of the predicted BER proteins CnApn1 and CnApn2 in the expression of some virulence-associated phenotypes of *C. neoformans* in vitro, such as the polysaccharide capsule, phospholipase and urease activities and melanization. We did not observe any defect in the capsule expansion after growth on inducing conditions at 30 or 37 °C (Figure S5A), phospholipase (Figure S5B) or urease activity (Figure S5C) in the mutant strains. However, deletion of *APN2*, but not of *APN1*, induced a marked delay in melanin production by *C. neoformans* at 37 °C in 1 mM L-DOPA-inducing medium (Figure 6). Prolonged incubation (144 h) resulted in late melanization of the *apn2*Δ and *apn1*Δ*apn2*Δ strains. This defect did not seem to be related to impaired cell growth or density, because there were no significant differences in CFU counts at 72 or 144 h after melanin synthesis among the strains (data not shown). The delayed melanin synthesis was reversed in the *apn2*Δ::*APN2* reconstituted strain (Figure 6).

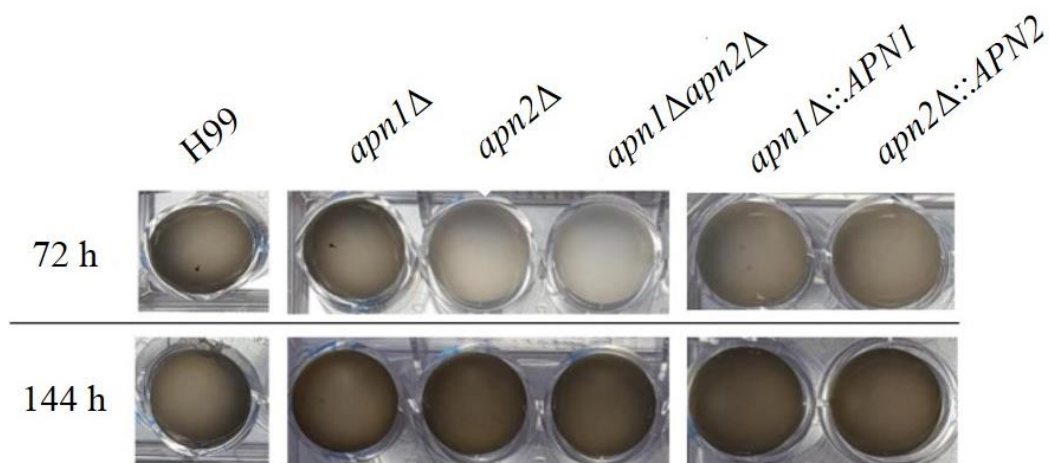


Figure 6. The disruption of the Apn2-like gene of *C. neoformans* impairs melanin production. *C. neoformans* yeasts were incubated in melanin-inducing minimal medium with 1 mM L-DOPA at 37 °C, 150 rpm, protected from light. Melanin production was visually assessed by the medium color change from translucent to brown and photo-documented at 72 and 144 h. The result is representative of three independent experiments.

3.8. The Recognition and Correction of Abasic Sites in DNA is Required for Proper Melanin Production by *C. Neoformans*

To confirm the role of *C. neoformans* Apn2 in melanin production, we decided to investigate the effects of MX presence during the induction of melanin synthesis. First, we evaluated possible effects on MX on fungal viability by treating cells of the different strains with 0.417, 0.834 or 1.67 mM of this compound for 1 h at 30 °C. As, at 0.417 mg/mL, this drug was not lethal to either the WT or mutant strains (Figure 7A), this concentration was chosen for the next experiments. The different strains were exposed to 0.417 mg/mL MX, washed and subject to melanin-inducing conditions. The pre-treatment of *C. neoformans* with MX delayed and reduced the melanization levels of the wild-type strain (Figure 7B), resulting in a phenotype similar to the one observed for the unexposed *apn2Δ* and *apn1Δapn2Δ* mutant strains under inducing conditions at 37 °C (Figure 7B). These effects were not associated with cell death, because there was no differences in CFU counts between untreated and treated samples (Figure 7C). Even after 10 days of incubation, the melanization levels of MX-treated wild-type or mutant strains did not increase (data not shown).

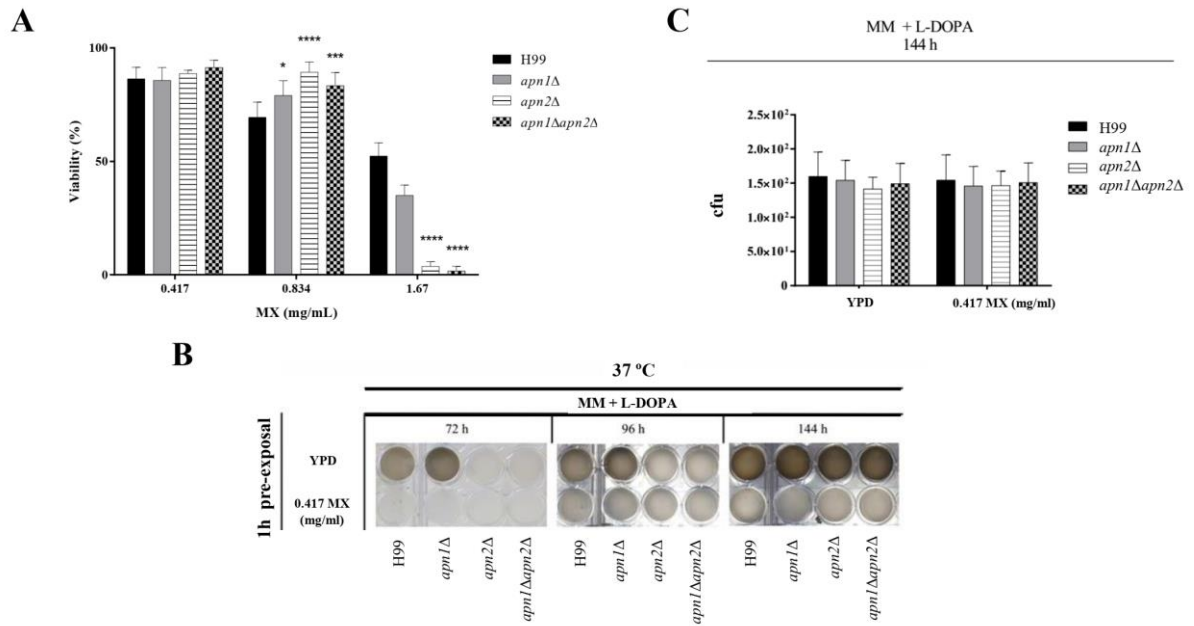


Figure 7. Apn1- and Apn2-like genes are required for melanin production by *C. neoformans*. **(A)** Viability of *C. neoformans* cells after exposure to methoxy-amine (MX). Cells of the WT and mutant strains were incubated in liquid YPD medium for 1 h, at 30 °C, and 150 rpm in the absence (control) or in the presence of MX (0, 0.417, 0.83 or 1.67 mg/mL). Cells were then PBS-washed and the number of CFUs was assessed. The graph represents the percent of survival of each strain exposed to MX compared to the control condition. The wild-type H99 was used as a control group for statistical comparison. One-way ANOVA with Dunnett post-test was used to compare the means of results from three independent experiments. Error bars represent standard errors of the mean. **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$. **(B)** Melanin production after exposure of yeast cells to MX. Cells from each strain were incubated with 0.417 mg/mL MX for 1 h, at 37 °C, PBS-washed, diluted and inoculated for melanin production analyses. Visual detection was performed daily and photo-documented after 72, 96 and 144 h of growth. Results are representative of three independent experiments. **(C)** Cell viability of *C. neoformans* strains after MX exposure and induction of melanin synthesis. Aliquots of cell suspensions were collected from the melanin assay plates after 144 h of incubation, and viable colonies were assessed by CFU counting. One-way ANOVA with Dunnett’s post-test was used to compare the means of results from three independent experiments.

3.9. Predicted *C. neoformans* Apn1 and Apn2 Proteins Influence Phagocytosis and Fungal Survival within Macrophages In Vitro

Phagocytes play multiple roles in cryptococcal pathogenesis, and the ability to survive and proliferate inside phagocytes is associated with patient outcome [51]. To assess the impact of Apn1 and Apn2 on *C. neoformans* virulence, we evaluated the in vitro interaction of the mutant strains with macrophages (activated BMDMs) by means of phagocytosis and killing assays. We observed a decrease in the rates of internalization and in the total number of internalized yeast cells from mutant strains in comparison to the WT (Figure 8A,B). In addition, the deletion of the APN2-like gene led to a reduced number of viable *C. neoformans* cells recovered from the macrophages (Figure 8C,D). Similar results were obtained for the *apn1Δapn2Δ* double mutant. In contrast, the absence of the APN1-like gene did not change the number of fungal CFUs after the interaction.

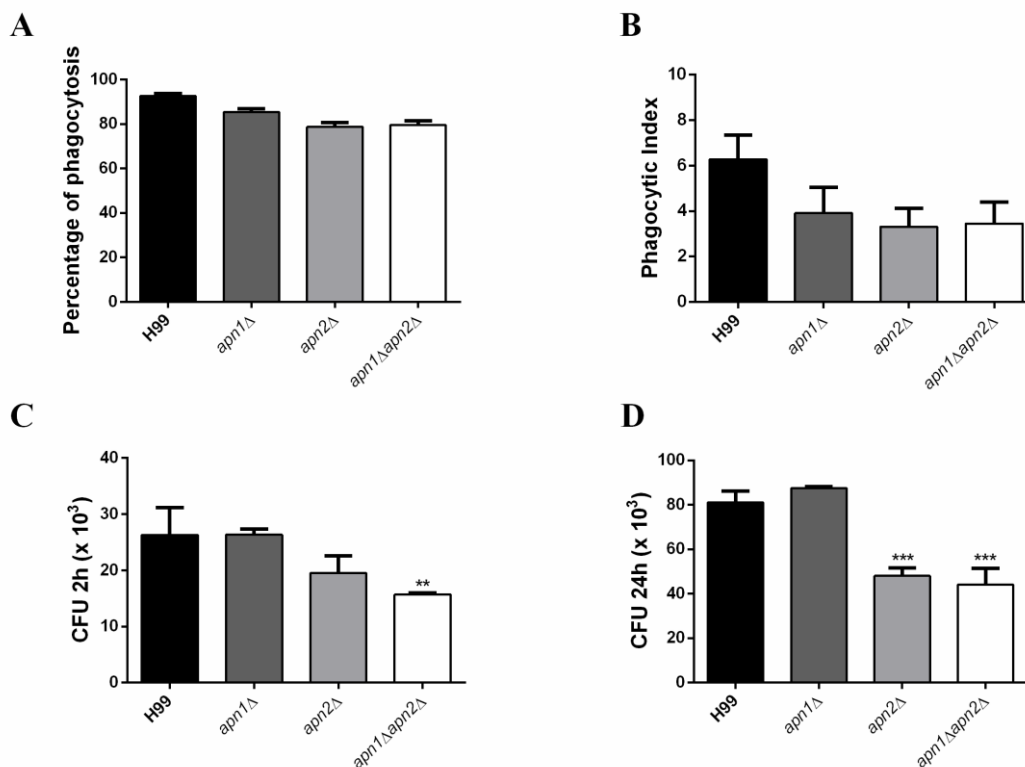


Figure 8. The deletion of APN-like genes results in *C. neoformans* reduced phagocytosis and survival in macrophages in vitro. Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were co-cultured for 2 h or 24 h with previously opsonized fungal cells from the different strains of *C. neoformans*. Each strain was inoculated into three wells of a 96-well polystyrene plate containing macrophages at a MOI of 5. (A) Percentage of phagocytosis. Data are presented as mean \pm 95% C.I. ($n = 3$ experiments, $*** p < 0.001$). (B) Phagocytic index. (C) CFU counts of *C. neoformans* strains recovered from bone marrow-derived macrophages (BMDMs) after 2 (D) or 24 h of co-incubation. Error bars represent standard errors of the mean of three biological replicate experiments. The wild-type H99 was used as a control group for statistical comparison. Statistical test: One-way ANOVA with Dunnett's post-test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3.10. Deletion of APN Genes Provokes Minor Effects in the Wax Moth Larva Model of Infection

In vivo effects of the deletion of *APN*-like genes in *C. neoformans* virulence were accessed by infection of *Galleria mellonella* larvae. Infection with both *apn2*Δ and *apn1*Δ*apn2*Δ strain resulted in slightly delayed killing kinetics compared to the wild type (Figure S6). The disruption of *APN1* did not alter fungal virulence in this model.

4. Discussion

In this work, we examined the role of two BER pathway Apn-like sequences in the proliferation, stress response and virulence of the human pathogen *C. neoformans*. We identified two genes encoding putative Apurinic/apyrimidinic (AP) endonucleases in this fungus' genome. The CnApn1 (CNAG_05468) predicted protein possesses the nfo domain (Exonuclease IV family), and is consistently different from CnApn2, an Xth family protein (Figure 1B). From the sequences analyzed in this study, only the Apn2 proteins from *C. neoformans*, *S. pombe* and *H. sapiens* possess a zf-GRF domain. The presence of the Athrofin-1 and zf-GRF domains indicates a transcription regulation activity for the deduced proteins [48,49]. The absence of this domain in the predicted CnApn1 and in the Apn2 proteins of other fungi suggests that Apn proteins might display distinct roles in DNA repair and cellular responses in yeasts.

C. neoformans (here CnApn2) was previously suggested to be a transcription factor after a screening performed by Jung et al. (2015) [52]. The authors evaluated the presence of DNA sequences associated with transcriptional activity in the *C. neoformans* genome database, detected that the CNAG_04268 null mutant had a growth defect at 39 °C and further characterized the potential role of this gene as transcription factor [52]. However, the authors did not discuss the homology of the CNAG_04268 deduced protein with DNA repair components, nor did they evaluate the effect of combined disruption of Apn1 and Apn2 in the context of DNA damage-response and survival of *C. neoformans*.

To investigate the potential roles of the predicted AP-endonucleases in the biology of *C. neoformans*, we constructed null mutant strains in which the *APN1* and *APN2* putative genes were deleted. The deletion of *APN*-like genes individually or simultaneously indicated that none of the *APN* putative genes is essential for *C. neoformans* growth under standard laboratory conditions. The disruption of those genes did not affect the response of *C. neoformans* to cell wall or membrane stressors (Figure S2). Similar results were previously reported in *S. cerevisiae*, *C. albicans* and *S. pombe* [19,22,23].

In addition, deletion of Cn*APN1* and Cn*APN2* putative genes did not affect the sensitivity of *C. neoformans* to different sources of oxidative stress (H_2O_2 , MND or $NaNO_2$) (Figure 2) as previously observed for *C. albicans* *apn1* Δ mutants exposed to H_2O_2 [22]. In contrast, the *apn2* Δ mutant was slightly sensitive to H_2O_2 [23,53]. In *S. cerevisiae*, the simultaneous ablation of the Ntg1, Ntg2, and Apn1 BER proteins resulted in increased recombination and mutation rates but did not influence the response to the oxidizing agents H_2O_2 and Menadione [54].

We demonstrated that *C. neoformans* *APN* deletions induced increased sensitivity to MMS, EMS, MX and UV radiation in a dose-dependent way (Figures 3 and 4). Notably, those agents are known to induce SSB (Single Strand Breaks) and DSB (Double Strand Breaks) on DNA. In contrast, a previous study reported that *C. albicans* BER and NER mutants exhibited a WT sensitivity to EMS and MMS [22,55], suggesting that the BER and NER pathways do not play a major role in repairing DNA breaks in this organism

[22,55]. They also observed that *APN2* deletion in *S. cerevisiae* did not affect its response to MMS-induced damage, but the *apn1Δapn2Δ* double mutant displayed a marked increased sensitivity to MMS in comparison to the *apn1Δ* strain [22,55].

In the *S. pombe* BER pathway, mutant strains *nth1Δ* and *apn2Δ* were sensitive to MMS while the *apn1Δ* strain was also sensitive to oxidative stress. *S. pombe apn2Δapn1Δ* double mutant was more sensitive to the oxidative stress than the *apn2Δ* single mutant [23]. Disruption of *APN2* in *S. pombe* also induced sensitivity to phleomycin, which indicates Apn2 as the major AP-endonuclease of this fungus [23].

We also observed that deletion of the *C. neoformans APN2*-like gene resulted in altered responses to alkylating agents, when compared to the WT and *apn1Δ* strains. The *C. neoformans apn2Δ* strain also presented reduced viability and increased genomic DNA fragmentation after exposure to Zeocin, a Bleomycin family drug (Figure 5). The *apn1Δ* mutant still possesses the *APN2* gene and presented the WT-type phenotype in response to Zeocin exposure. Taken together, these data suggest that Apn2 is the major contributor not only to the AP-endonuclease but also to the 3'-phosphodiesterase activity in *C. neoformans*. Curiously, although the Zeocin exposure induced significant death in all mutant strains, it did not provoke DNA fragmentation for the *apn1Δapn2Δ* double mutant strains. This suggests that the mechanism of death induced by Zeocin may be different for this mutant, not necessarily inducing major DNA fragmentation, such as by accumulation of abasic sites, by blocking RNA transcription and/or by cell cycle arrest.

The differences observed in the BER mutant strains' responses to UV radiation and alkylating agents of *C. albicans* and *S. cerevisiae* compared to *C. neoformans* and *S. pombe* could be associated with the proteins' structure. The human homologues of the yeast Apn proteins are involved in the repair of DSB of DNA [56,57] and HsAPE2 presents a robust 3'→5' exonuclease activity towards mismatched 3'-terminal bases, as well as 3'-phosphoglycolate removal activity [57–59]. The *S. pombe* Apn2 and the *C. neoformans* predicted Apn2 protein both present the same zf-GRF domain described as important for the HsAPE2 3' exonuclease activity, which is absent in the related proteins of *C. albicans* and *S. cerevisiae*, and also in CnApn1 (Figure 1). Our observations suggest that the predicted AP-endonuclease 2 of *C. neoformans* potentially plays a role in additional DNA repair pathways, beyond BER, probably acting in the recognition and correction of SSB and DSB on DNA.

The differences between CnApn1 and CnApn2 sequence domains are probably the reason for the consistent distinct phenotypes of Apn single mutants in response to stress conditions. Apn1 possesses only an AP-endonuclease domain and *apn1Δ* mutants presented, in general, phenotypes similar to the WT strain. Only the dose-dependent response to lower doses of UV radiation and H₂O₂ + MX co-exposure phenotypes were specific for *apn1Δ*.

The resistance to lower doses of UV radiation observed in the *apn1Δ* mutant strain could be associated with the reduction of DNA cleavage performed by Apn1. The absence of Apn1 could reduce the cleavage of DNA strands at AP-sites (a UV-radiation induced lesion) and consequently the formation of phosphodiester gaps in

DNA strain. This mechanism can be associated with the data observed in Figure 5, when *apn2Δ* mutants presented a WT phenotype in response to 3 mM H₂O₂ + MX, a combination that induces base oxidation and AP-sites in DNA. The *apn2Δ* mutant strain still possesses active Apn1 proteins, whose activity could be sufficient to maintain the WT-phenotype in the *apn2Δ* mutant strain.

On the other hand, Apn2 possesses domains involved in biological processes that go beyond DNA repair. The *apn2Δ* strain was more susceptible to UV radiation, alkylation, oxidative and antibiotic stress. Apn2 was also listed as a transcription factor, so it is possible that some of the distinct phenotypes presented by the mutant strain result from the absence of Apn2 transcriptional activity. The *apn1Δapn2Δ* double mutant presented similar phenotypes to *apn2Δ*, except for the DNA fragmentation pattern and the susceptibility to H₂O₂ with MX. The phenotypes observed for double mutants do not always correspond to the absence of individual genes, nor even to a synergic effect of both deletions. Therefore, it is important to note that the *apn1Δapn2Δ* mutant may have a specific mechanism of cellular response to stress in order to compensate for the disruption of the cellular AP- endonuclease activity.

Cryptococcosis affects thousands of people yearly and, although it is important to global health, therapeutic options are extremely limited [60]. We demonstrated that the deletion of the *APN2*-like gene slightly increased *C. neoformans*' susceptibility to fluconazole exposure, and that the simultaneous deletion of both predicted APN sequences increased the fungus' sensitivity to AmpB and fluconazole in vitro. We also demonstrated that exposure of *C. neoformans* to the synthetic AP-site inhibitor MX in combination with AmpB significantly enhanced its antifungal effect, even for the WT strain (Table 2). MX also sensitized cells to the oxidative stress induced by H₂O₂ (Figure 5B).

DNA repair-inhibitor drugs, such as MX, are well established in clinical practice as adjuvants [32]. Given the emergence of antifungal drug-resistant strains and the increasing incidence of systemic and invasive mycoses [33,61,62], the identification of novel antifungal drug targets and adjuvant options is an urgent clinical need. We demonstrated the synergism between MX and AmpB, with an increased fungicidal effect on concentrations higher than 75 μg/mL of MX. Although 75 and 150 μg/mL of MX are higher concentrations than those used in clinical trials in cancer therapies (100 mg/m² or 50 ng/mL of plasma) [63], our results are still promising. The synergic effect of MX and AmpB is an interesting starting point for further investigations and highlights the possibility of using DNA repair inhibitors as a class of adjuvants in antifungal therapy research.

The deposition of melanin in the cell wall is critical to the virulence of *C. neoformans* and other pathogenic fungi [64–66]. We demonstrated that the disruption of *APN*-like genes resulted in a delay and significantly lower levels of melanin production by *C. neoformans* (Figure 6) without compromising cell viability or growth rate. Melanin production is activated by oxidative stress conditions in several microorganisms [65,66]. In the absence of Apn

activity, overlapping enzyme repair systems may be activated later to eliminate the DNA damage accumulation and proceed with melanin synthesis. This might explain the restored melanin production after 144 h hours in the mutant strains (Figure 6). According to our data, not only the AP-endonuclease activity of Apn proteins, but also the generation/repair of the abasic site itself, might play a role in melanin production by *C. neoformans*, since the pre-treatment of *C. neoformans* strains with MX for 1 h had a significant impact on the production of the pigment, even in the WT strain (Figure 7). MX is highly specific and rapidly binds to abasic sites on DNA. The MX-AP-site ligation is strong and stable [67]. Therefore, the phenotype of melanin production blockage is prolonged (10 days), and it is observed even in response to a short time of drug exposure.

C. neoformans is resistant to the host cell's oxidative stress response, mainly due to the production of melanin and antioxidant compounds [37,39]. Several studies have demonstrated a correlation between the capacity of *C. neoformans* clinical strains to be phagocytosed, and/or to proliferate intracellularly, and poor patient outcomes [68–70]. Due to their potential role in melanization, we extended our analysis to evaluate the APN-like mutant's virulence during their interaction with macrophages and *G. mellonella* larvae. Interestingly, both *C. neoformans* APN-like mutants were less efficiently internalized and more susceptible to killing by M2 macrophages in vitro (Figure 8). The involvement of DNA repair proteins in complex responses, such as interaction with phagocytes, was not exactly expected.

Santiago et al. (2015) used a mutant library screen to list genes involved in macrophage uptake and demonstrated several non-expected genes involved in pathogen-host interaction [51]. One of the listed genes was *APN1*, responsible for a decrease in macrophage up-take. However, the mechanism of how individual gene products modulate interactions with host phagocytes is still poorly understood. Since no significant difference was observed in capsule enlargement between *apn* mutants, other characteristics may be altered in these mutants to influence fungal internalization. We hypothesized the participation of Apn proteins in other cellular mechanisms, beyond DNA repair, as occurs for the mammalian homologue APE1 [17,71]. The impact of Apn proteins' absence on fungal survival inside macrophages may be associated, even in part, with the delay in melanin production, sensitizing the cells to the oxidative stress induced by the phagocyte. This idea can also be the reason for the slight delay in *G. mellonella* killing by *apn2Δ* and *apn1Δapn2Δ* mutant strains (Figure S6), but much is still to be clarified.

5. Conclusions

This work demonstrated the impact of AP-endonucleases-like genes in the *C. neoformans* response to cell stress resistance and virulence. *C. neoformans* AP endonucleases-like genes were shown to be important in protecting the yeast cells against alkylation and UV-induced damage in vitro. The disruption of *C. neoformans* putative Apn proteins delayed the production of melanin, one of the most important virulence factors in this fungus. The melanin

production defect seems to be related to the absence of AP-repair activity, since the exposure to MX completely abolished the pigment production. The MX sensitized *C. neoformans* to H₂O₂ exposure and boosted the fungicidal effect of AmpB, in a synergic way. The Apn-like activities were also required for the interaction and growth inside murine macrophages. This work highlighted the importance of DNA repair pathways for *C. neoformans*' response to cell stress conditions and the potential use of DNA repair inhibitors to improve the antimicrobial effect of antifungal drugs.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Confirmation of knockout mutants by genomic DNA PCR amplification, Figure S2: Temperature and chemical cell stress-related phenotypes of the *C. neoformans* APN-like genes' mutants, Figure S3: Growth curve of *C. neoformans* WT and mutant strains, Figure S4: The *apn1Δ*, *apn2Δ* and *apn1Δapn2Δ* mutants are not susceptible to oxidizing agents, Figure S5: The capsule expansion, phospholipase and urease activities were unaffected by the disruption of Apn-like genes, Figure S6: Evaluation of virulence of *C. neoformans* APN mutants using *G. mellonella* infection model, Table S1: Primers used in this study and Table S2: Strains used in this study.

Author Contributions: Conceptualization, R.K.d.M.O.; methodology, F.F.F., K.R., R.K.d.M.O., P.H.G. and L.L.P.; validation, R.K.d.M.O., F.A.H. and L.L.P.; formal analysis, R.K.d.M.O.; investigation, R.K.d.M.O. and L.L.P.; resources R.K.d.M.O., F.A.H., P.H.G. and L.L.P., data curation, R.K.d.M.O.; writing—original draft preparation, R.K.d.M.O.; writing—review and editing, R.K.d.M.O., M.J.P.-F., I.S.-P., P.A. and L.F.; supervision, M.J.P.-F., I.S.-P. and L.F.; project administration, R.K.d.M.O., I.S.-P. and L.F.; funding acquisition, I.S.-P. and L.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq-Brazil; 431958/2016-5) and the “Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal” (FAP-DF, Brazil)/CNPq (PRONEX 0193.001.200/2016). R. K.d.M.O. received a PhD fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil)

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the national and institutional guidelines for animal care and were approved by the University of Brasilia (UnB) Committee of Ethical Use of Animals (Proc. UnB Doc 52657/2011).

Informed Consent Statement: Not applicable

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors upon reasonable request.

Acknowledgments: We thank the Molecular Biology and Molecular Pathology Graduate Programs (UnB) for their fellowship support of R.K.d.M.O.; K.R. and F.A.H

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Breivik, J.; Gaudernack, G. Resolving the evolutionary paradox of genetic instability: a cost-benefit analysis of DNA repair in changing environments. *FEBS Lett.* **2004**, *563*, 7–12, doi:10.1016/S0014-5793(04)00282-0.
2. Rosenberg, S.M. Mutation for survival. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1997**, *7*, 829–834, doi:10.1016/S0959-437X(97)80047-0.
3. Dion-Côté, A.-M.; Barbash, D.A. Beyond speciation genes: an overview of genome stability in evolution and speciation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2017**, *47*, 17–23, doi:10.1016/J.GDE.2017.07.014.
4. Ciccia, A.; Elledge, S.J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell* **2010**, *40*, 179–204, doi:10.1016/j.molcel.2010.09.019.
5. Pichiorri, F.; Ishii, H.; Okumura, H.; Trapasso, F.; Wang, Y.; Huebner, K. Molecular parameters of genome instability: Roles of fragile genes at common fragile sites. *J. Cell. Biochem.* **2008**, *104*, 1525–1533, doi:10.1002/jcb.21560.
6. Iyama, T.; Wilson, D.M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*. **2013**, *12*, 620–636, doi:10.1016/j.dnarep.2013.04.015.
7. Friedberg, E.C.; Aguilera, A.; Gellert, M.; Hanawalt, P.C.; Hays, J.B.; Lehmann, A.R.; Lindahl, T.; Lowndes, N.; Sarasin, A.; Wood, R.D. DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair (Amst)*. **2006**, *5*, 986–96, doi:doi: 10.1016/j.dnarep.2006.05.005.
8. Krokan, H.E.; Bjørås, M. Base excision repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a012583, doi:10.1101/cshperspect.a012583.
9. DO, Z. Base Excision DNA Repair. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, doi:10.1007/S00018-008-7543-2.
10. Schermerhorn, K.M.; Delaney, S. A. Chemical and Kinetic Perspective on Base Excision Repair of DNA. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, doi:10.1021/AR400275A.
11. Izumi, T.; Hazra, T.K.; Boldogh, I.; Tomkinson, a E.; Park, M.S.; Ikeda, S.; Mitra, S. Requirement for human AP endonuclease 1 for repair of 3'-blocking damage at DNA single-strand breaks induced by reactive oxygen species. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 1329–34, doi:10.1093/carcin/21.5.329.
12. Popoff, S.C.; Spira, A.I.; Johnson, A.W.; Demple, B. Yeast structural gene (APN1) for the major apurinic endonuclease: homology to Escherichia coli endonuclease IV. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1990**, *87*, 4193–4197, doi:10.1073/PNAS.87.11.4193.
13. Daley, J.M.; Zakaria, C.; Ramotar, D. The endonuclease IV family of apurinic/apyrimidinic endonucleases. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **2010**, *705*, 217–227, doi:10.1016/j.mrrev.2010.07.003.
14. Demple, B.; Herman, T.; Chen, D.S. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 11450–4, doi:10.1073/pnas.88.24.11450.
15. Li, M.; Wilson, D.M. Human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *20*, 678–707, doi:10.1089/ars.2013.5492.
16. Fleming, A.M.; Ding, Y.; Burrows, C.J. Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 2604–2609, doi:10.1073/pnas.1619809114.
17. Evans, A.R.; Limp-Foster, M.; Kelley, M.R. Going APE over ref-1. *Mutat. Res.* **2000**, *461*, 83–108, doi:10.1016/s0921-8777(00)00046-x.
18. Amente, S.; Bertoni, A.; Morano, A.; Lania, L.; Avvedimento, E. V; Majello, B. LSD1-mediated demethylation of histone H3 lysine 4 triggers Myc-induced transcription. *Oncogene* **2010**, *29*, 3691–702, doi:10.1038/onc.2010.120.
19. Johnson, R.E.; Torres-Ramos, C.A.; Izumi, T.; Mitra, S.; Prakash, S.; Prakash, L. Identification of APN2, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the major human AP endonuclease HAP1, and its role in the repair of abasic sites. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 3137–3143, doi:10.1101/gad.12.19.3137.
20. Unk, I.; Haracska, L.; Johnson, R.E.; Prakash, S.; Prakash, L. Apurinic endonuclease activity of yeast Apn2 protein. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 22427–34, doi:10.1074/jbc.M002845200.
21. Bennett, R.A.O. The *Saccharomyces cerevisiae* *ETH1* Gene, an Inducible Homolog of Exonuclease III That Provides Resistance to DNA-Damaging Agents and Limits Spontaneous Mutagenesis. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 1800–1809, doi:10.1128/MCB.19.3.1800.
22. Legrand, M.; Chan, C.L.; Jauert, P.A.; Kirkpatrick, D.T. Analysis of base excision and nucleotide excision repair in *Candida albicans*. *Microbiology* **2008**, *154*, 2446–2456, doi:10.1099/mic.0.2008/017616-0.
23. Ribar, B.; Izumi, T.; Mitra, S. The major role of human AP-endonuclease homolog Apn2 in repair of abasic sites in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 115, doi:10.1093/NAR/GKH151.
24. Sipiczki, M. Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol.* **2000**, *1*, 1–4, doi:10.1186/gb-2000-1-2-reviews1011.
25. Merlo, D.; Cuchillo-Ibañez, I.; Parlato, R.; Rammes, G. DNA Damage, Neurodegeneration, and Synaptic Plasticity. *Neural Plast.* **2016**, *2016*, doi:10.1155/2016/1206840.

26. Penndorf, D.; Witte, O.W.; Kretz, A. DNA plasticity and damage in amyotrophic lateral sclerosis. *Neural Regen. Res.* **2018**, *13*, 173, doi:10.4103/1673-5374.226377.
27. Koch, S.C.; Simon, N.; Ebert, C.; Carell, T. Molecular Mechanisms of Xeroderma Pigmentosum (XP) Proteins. *Q. Rev. Biophys.* **2016**, *49*, doi:10.1017/S0033583515000268.
28. Machado, C.R.; Menck, C.F.M. Human DNA repair diseases: From genome instability to cancer. *Brazilian J. Genet.* **1997**, *20*, 755–762, doi:10.1590/S0100-84551997000400032.
29. Gavande, N.S.; VanderVere-Carozza, P.S.; Hinshaw, H.D.; Jalal, S.I.; Sears, C.R.; Pawelczak, K.S.; Turchi, J.J. DNA repair targeted therapy: The past or future of cancer treatment? *Pharmacol. Ther.* **2016**, *160*, 65–83, doi:10.1016/J.PHARMTHERA.2016.02.003.
30. Lee, W.; St.Onge, R.P.; Proctor, M.; Flaherty, P.; Jordan, M.I.; Arkin, A.P.; Davis, R.W.; Nislow, C.; Giaever, G.; Friedberg, E.; et al. Genome-Wide Requirements for Resistance to Functionally Distinct DNA-Damaging Agents. *PLoS Genet.* **2005**, *1*, e24, doi:10.1371/journal.pgen.0010024.
31. Zhang, J.; Stevens, M.F.G.; Bradshaw, T.D. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Curr. Mol. Pharmacol.* **2012**, *5*, doi:10.2174/1874467211205010102.
32. Liu, L.; Gerson, S.L. Therapeutic impact of methoxyamine: blocking repair of abasic sites in the base excision repair pathway. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2004**, *5*, 623–7.
33. Scorzonni, L.; de Paula E Silva, A.C.A.; Marcos, C.M.; Assato, P.A.; de Melo, W.C.M.A.; de Oliveira, H.C.; Costa-Orlandi, C.B.; Mendes-Giannini, M.J.S.; Fusco-Almeida, A.M. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 36, doi:10.3389/fmicb.2017.00036.
34. Belenky, P.; Camacho, D.; Collins, J.J. Fungicidal Drugs Induce a Common Oxidative-Damage Cellular Death Pathway. *Cell Rep.* **2013**, *3*, 350–358, doi:10.1016/j.celrep.2012.12.021.
35. Boiteux, S.; Gellon, L.; Guibourt, N. Repair of 8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*: interplay of DNA repair and replication mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *32*, 1244–53, doi:10.1016/s0891-5849(02)00822-5.
36. Missall, T.A.; Lodge, J.K.; McEwen, J.E. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryot. Cell* **2004**, *3*, 835–46, doi:10.1128/EC.3.4.835-846.2004.
37. Magditch, D.A.; Liu, T.-B.; Xue, C.; Idnurm, A.; Park, B.; Wannemuehler, K.; Marston, B.; Govender, N.; Pappas, P.; 3rd, E.B.; et al. DNA Mutations Mediate Microevolution between Host-Adapted Forms of the Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002936, doi:10.1371/journal.ppat.1002936.
38. Liu, O.W.; Chun, C.D.; Chow, E.D.; Chen, C.; Madhani, H.D.; Noble, S.M. Systematic Genetic Analysis of Virulence in the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Cell* **2008**, *135*, 174–188, doi:10.1016/j.cell.2008.07.046.
39. Brunke, S.; Seider, K.; Fischer, D.; Jacobsen, I.D.; Kasper, L.; Jablonowski, N.; Wartenberg, A.; Bader, O.; Enache-Angoulvant, A.; Schaller, M.; et al. One Small Step for a Yeast - Microevolution within Macrophages Renders *Candida glabrata* Hypervirulent Due to a Single Point Mutation. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004478, doi:10.1371/journal.ppat.1004478.
40. Esher, S.K.; Zaragoza, O.; Alspaugh, J.A. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2018**, *113*, doi:10.1590/0074-02760180057.
41. Rajasingham, R.; Smith, R.M.; Park, B.J.; Jarvis, J.N.; Govender, N.P.; Chiller, T.M.; Denning, D.W.; Loyse, A.; Boulware, D.R. Global Burden of Disease of HIV-associated Cryptococcal Meningitis: An Updated Analysis. *Lancet. Infect. Dis.* **2017**, *17*, doi:10.1016/S1473-3099(17)30243-8.
42. Kwon-Chung, K.J.; Fraser, J.A.; Doering, T.L.; Wang, Z.; Janbon, G.; Idnurm, A.; Bahn, Y.-S. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4*, doi:10.1101/CSHPERSPECT.A019760.
43. Kim, M.S.; Kim, S.-Y.; Yoon, J.K.; Lee, Y.-W.; Bahn, Y.-S. An efficient gene-disruption method in *Cryptococcus neoformans* by double-joint PCR with NAT-split markers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *390*, 983–8, doi:10.1016/j.bbrc.2009.10.089.
44. Price, M.F.; Wilkinson, I.D.; Gentry, L.O. Plate Method for Detection of Phospholipase Activity in *Candida Albicans*. *Sabouraudia* **1982**, *20*, doi:10.1080/00362178285380031.
45. Pfaller, M.A.; Rhomberg, P.R.; Messer, S.A.; Castanheira, M. In vitro activity of a Hos2 deacetylase inhibitor, MGCD290, in combination with echinocandins against echinocandin-resistant *Candida* species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2015**, *81*, 259–263, doi:https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.11.008.
46. Lutz, M.B.; Kukutsch, N.; Ogilvie, A.L.; Rößner, S.; Koch, F.; Romani, N.; Schuler, G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* **1999**, *223*, 77–92, doi:10.1016/S0022-1759(98)00204-X.

47. García-Rodas, R.; Casadevall, A.; Rodríguez-Tudela, J.L.; Cuenca-Estrella, M.; Zaragoza, O. *Cryptococcus neoformans* Capsular Enlargement and Cellular Gigantism during *Galleria mellonella* Infection. *PLoS One* **2011**, *6*, e24485, doi:10.1371/journal.pone.0024485.
48. Lu, S.; Wang, J.; Chitsaz, F.; Derbyshire, M.K.; Geer, R.C.; Gonzales, N.R.; Gwadz, M.; Hurwitz, D.I.; Marchler, G.H.; Song, J.S.; et al. CDD/SPARCLE: The conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D265–D268, doi:10.1093/nar/gkz991.
49. Wang, L.; Tsai, C.C. Atrophin proteins: an overview of a new class of nuclear receptor corepressors. *Nucl. Recept. Signal.* **2008**, *6*, doi:10.1621/nrs.06009.
50. Chankova, S.G.; Dimova, E.; Dimitrova, M.; Bryant, P.E. Induction of DNA double-strand breaks by zeocin in *Chlamydomonas reinhardtii* and the role of increased DNA double-strand breaks rejoining in the formation of an adaptive response. *Radiat. Environ. Biophys.* **2007**, *46*, 409–416, doi:10.1007/s00411-007-0123-2.
51. Santiago-Tirado, F.H.; Peng, T.; Yang, M.; Hang, H.C.; Doering, T.L. A Single Protein S-acyl Transferase Acts through Diverse Substrates to Determine Cryptococcal Morphology, Stress Tolerance, and Pathogenic Outcome. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1004908, doi:10.1371/journal.ppat.1004908.
52. Jung, K.-W.; Yang, D.-H.; Maeng, S.; Lee, K.-T.; So, Y.-S.; Hong, J.; Choi, J.; Byun, H.-J.; Kim, H.; Bang, S.; et al. Systematic functional profiling of transcription factor networks in *Cryptococcus neoformans*. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6757, doi:10.1038/ncomms7757.
53. Osman, F.; Bjørås, M.; Alseth, I.; Morland, I.; McCready, S.; Seeberg, E.; Tsaneva, I. A new *Schizosaccharomyces pombe* base excision repair mutant, nth1, reveals overlapping pathways for repair of DNA base damage. *Mol. Microbiol.* **2003**, *48*, 465–80, doi:10.1046/J.1365-2958.2003.03440.X.
54. Swanson, R.L.; Morey, N.J.; Doetsch, P.W.; Jinks-Robertson, S. Overlapping specificities of base excision repair, nucleotide excision repair, recombination, and translesion synthesis pathways for DNA base damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 2929–35, doi:10.1128/mcb.19.4.2929.
55. Legrand, M.; Chan, C.L.; Jauert, P.A.; Kirkpatrick, D.T. Role of DNA Mismatch Repair and Double-Strand Break Repair in Genome Stability and Antifungal Drug Resistance in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **2007**, *6*, 2194–2205, doi:10.1128/EC.00299-07.
56. Schrader, C.E.; Guikema, J.E.; Wu, X.; Stavnezer, J. The roles of APE1, APE2, DNA polymerase β and mismatch repair in creating S region DNA breaks during antibody class switch. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2009**, *364*, 645–652, doi:10.1098/rstb.2008.0200.
57. Burkovics, P.; Szukacsov, V.; Unk, I.; Haracska, L. Human Ape2 protein has a 3'-5' exonuclease activity that acts preferentially on mismatched base pairs. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2508–2515, doi:10.1093/nar/gkl259.
58. Hossain, M.A.; Lin, Y.; Yan, S. Single-Strand Break End Resection in Genome Integrity: Mechanism and Regulation by APE2. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, doi:10.3390/IJMS19082389.
59. Hadi, M.Z.; Ginalski, K.; Nguyen, L.H.; Wilson, D.M. Determinants in nuclease specificity of ape1 and ape2, human homologues of *Escherichia coli* exonuclease III. *J. Mol. Biol.* **2002**, *316*, 853–866, doi:10.1006/JMBL.2001.5382.
60. Mourad, A.; Perfect, J.R.; Mourad, A.; Perfect, J.R. The war on cryptococcosis: A Review of the antifungal arsenal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2018**, *113*, doi:10.1590/0074-02760170391.
61. Kwon-Chung, K.J.; Chang, Y.C. Aneuploidy and Drug Resistance in Pathogenic Fungi. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1003022, doi:10.1371/journal.ppat.1003022.
62. Altamirano, S.; Fang, D.; Simmons, C.; Sridhar, S.; Wu, P.; Sanyal, K.; Kozubowski, L. Fluconazole-Induced Ploidy Change in *Cryptococcus neoformans* Results from the Uncoupling of Cell Growth and Nuclear Division. *mSphere* **2017**, *2*, doi:10.1128/mSphere.00205-17.
63. Weiss, G.J.; Gordon, M.S.; Rosen, L.S.; Savvides, P.; Adams, B.J.; Alvarez, D.; Liu, L.; Xu, Y.; Gerson, S.L.; Leigh, B.R. Final results from a phase I study of oral TRC102 (methoxyamine HCl), an inhibitor of base-excision repair, to potentiate the activity of pemetrexed in patients with refractory cancer. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 2576, doi:10.1200/jco.2010.28.15_suppl.2576.
64. Casadevall, A. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biol. Rev.* **2007**, *21*, 130, doi:10.1016/j.fbr.2007.02.007.
65. Gomez, B.L.; Nosanchuk, J.D. Melanin and Fungi. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2003**, *16*, doi:10.1097/00001432-200304000-00005.
66. Nosanchuk, J.D.; Stark, R.E.; Casadevall, A. Fungal Melanin: What do We Know About Structure? *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1463, doi:10.3389/fmicb.2015.01463.
67. Gurkan-Cavusoglu, E.; Avadhani, S.; Liu, L.; Kinsella, T.J.; Loparo, K.A. Developing an in silico model of the modulation of base excision repair using methoxyamine for more targeted cancer therapeutics. *IET Syst. Biol.* **2013**, *7*, 27–37, doi:10.1049/iet-syb.2011.0045.

68. Sabiiti, W.; May, R.C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Future Microbiol.* **2012**, *7*, 1297–313, doi:10.2217/fmb.12.102.
69. Sabiiti, W.; Robertson, E.; Beale, M.A.; Johnston, S.A.; Brouwer, A.E.; Loyse, A.; Jarvis, J.N.; Gilbert, A.S.; Fisher, M.C.; Harrison, T.S.; et al. Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis. *J. Clin. Invest.* **2014**, *124*, 2000–2008, doi:10.1172/JCI72950.
70. Alanio, A.; Desnos-Ollivier, M.; Dromer, F. Dynamics of *Cryptococcus neoformans*-macrophage interactions reveal that fungal background influences outcome during cryptococcal meningoencephalitis in humans. *MBio* **2011**, *2*, e00158-11, doi:10.1128/mBio.00158-11.
71. Tell, G.; Quadrioglio, F.; Tiribelli, C.; Kelley, M.R. The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme. *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *11*, 601–20, doi:10.1089/ars.2008.2194.

Capítulo II

Caracterização do gene *XPC* de *C. neoformans*.

6. Introdução

A via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é uma via importante para a correção de lesões *bulky* no DNA associadas à exposição à radiação, como os dímeros de pirimidina (Gillet and Schärer 2006). Em organismos de vida livre, como *C. neoformans*, a exposição à luz solar impõe ao organismo mecanismos de defesa contra danos celulares induzidos pela radiação, além de sistemas eficazes de correção de lesões geradas no DNA. Os genes envolvidos no sistema NER não são conservados em procariotos e eucariotos, contudo os princípios de reconhecimento das lesões ocorre de maneira bastante parecida (Y. Liu et al. 2011). A via NER de humanos envolve aproximadamente 30 proteínas diferentes e é bastante estudada, uma vez que a ausência de apenas uma das proteínas do sistema NER desencadeia uma doença limitante chamada *Xeroderma Pigmentosum* (Aboussekhra et al. 1995). Dada a complexidade e impacto da condição para os pacientes diagnosticados com *Xeroderma Pigmentosum*, as iniciais da doença foram usadas para denominar várias proteínas envolvidas na via NER, como XPA, XPB, XPC e etc.

A via NER pode ocorrer por dois mecanismos, a via NER iniciada em qualquer ponto do genoma (GG-NER, do inglês *global genome-NER*) e a via NER associada à RNA polimerase e a transcrição, envolvida na correção de lesões na fita de DNA que está sendo transcrita (TC-NER, do inglês *transcription-coupled NER*) (Gillet and Schärer 2006; Hanawalt 2003; Orlando D. Schärer 2013; Vermeulen and Fousteri 2013). Resumidamente, as etapas da via NER são: o complexo formado pelas proteínas XPC-RAD23 reconhece a desestabilização helicoidal local causada por uma lesão no DNA e interage com TFIIH. O complexo TFIIH se fixa ao DNA em local próximo à lesão por meio de sua subunidade XPB, permitindo que a helicase XPD rastreie ao longo do DNA verificando a presença de lesões. A formação do complexo XPC-TFIIH na lesão é o que permite a formação do complexo de pré-incisão (associação das proteínas TFIIH, XPA, RPA, XPG e ERCC1-XP) para fazer uma incisão dupla na fita danificada, removendo o dano. O *gap* resultante é preenchido por DNA polimerases (Pol δ e Pol κ ou Pol ϵ), juntamente com PCNA (do inglês *Proliferating cell nuclear antigen*), e a fita selada pela ação da DNA ligase I (Orlando D. Schärer 2013) (**Figura 28**).

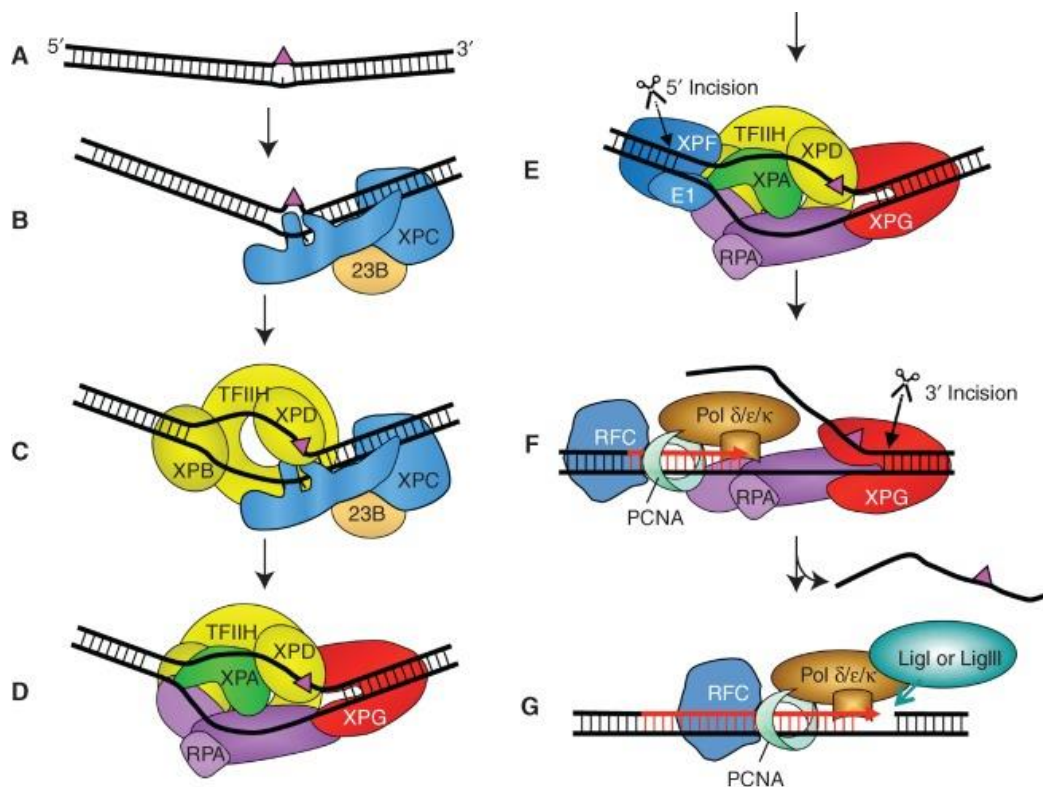


Figura 28. Representação da atividade de reparo de lesões por excisão de nucleotídeos (NER) em mamíferos. **A)** Lesões volumosas de DNA que desestabilizam a dupla fita. Essas lesões podem advir de diferentes agentes e condições. **B)** Na via GG-NER (via de reparo genômico), lesões com forte distorção são reconhecidas diretamente pelo complexo XPC-RAD23B, que se liga à fita não danificada oposta à lesão. **C)** TFIIH interage com XPC-RAD23B e abre o DNA com sua subunidade XPB, permitindo que XPD rastreie o DNA até parar no dano. Em seguida, o complexo verifica a modificação química (volume) da lesão. **D)** O bloqueio de XPD na lesão permite a formação do complexo de pré-incisão por recrutamento de XPA, RPA e XPG. **E)** Recrutamento de ERCC1-XPF para o complexo (por interação com XPA) leva à incisão na porção 5' da lesão. **F)** Início da síntese de reparo por Pol δ e Pol κ ou Pol ε e fatores associados, seguido por incisão na porção 3' por XPG. **G)** A conclusão da síntese de reparo e selagem do corte por DNA ligase IIIα / XRCC1 ou DNA ligase I completa o processo. Adaptado de Schäfer, 2013.

O passo inicial de reconhecimento das lesões bulky no DNA, realizado pelo complexo XPC-RAD23B na via GG-NER está relacionado, na grande maioria dos casos, à eficiência final da via NER (Geacintov and Broyde 2017). A proteína XPC é a primeira a reconhecer e se ligar ao DNA e é necessária à formação de todos os fatores envolvidos no reparo de lesões induzidas por radiação UV (Sugasawa et al. 2001; Hoogstraten et al. 2008).

Em leveduras o complexo de iniciação da via NER é formado pelo ortólogo de XPC (Rad4) e a RAD23 [revisado por (Orlando D. Schäfer 2013)]. Usando apenas energia térmica, o Rad4 analisa o genoma e reconhece especificamente as lesões, iniciando o recrutamento de outros fatores componentes da via NER. Esses fatores, em última

instância, retiram e reparam a porção danificada do DNA. Em leveduras, as lesões reconhecidas por Rad4 incluem fotoprodutos induzidos por luz ultravioleta (ou adutos de base volumosa) e adutos *intrastrand* induzidos por genotoxinas ambientais (X. Chen et al. 2015). Essas lesões são estruturalmente diversas, mas culminam na desestabilização e/ou distorção local da dupla hélice de DNA (Prakash and Prakash 2000; Velmurugu et al. 2016). Estudos cristalográficos demonstraram que Rad4 não contata diretamente os nucleotídeos danificados, mas acomoda seletivamente os nucleotídeos não danificados na fita complementar; tal ligação indireta permite que Rad4 reconheça lesões extraordinariamente diversas, podendo ainda participar da correção de lesões comumente reconhecidas por outras vias de reparo de DNA (X. Chen et al. 2015).

Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a importância do gene CNAG_01338 presente no genoma de *C. neoformans*, aqui intitulado *XPC*, codificador da proteína hipotética Rad4 de *C. neoformans* na resposta à agentes estressores e virulência fúngica.

7. Resultados

7.1. O gene *XPC* de *C. neoformans* codifica uma proteína semelhante à Rad4 de *S. cerevisiae*.

Para avaliar as características do gene *XPC* de *C. neoformans* foram feitas análises de alinhamento de sequências usando as ferramentas Blatx do NCBI. Foi utilizada a sequência CNAG_01338 do gene *XPC* de *C. neoformans* como entrada (*query*) na pesquisa em bancos de dados voltados aos organismos *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. albicans* e *H. sapiens*. Os resultados são apresentados na **Figura 29**. As sequências que codificam as proteínas Rph41 e Rph 42 de *S. pombe* foram as que apresentarem maiores valores de identidade com a sequência de *XPC* de *C. neoformans*. As sequências que codificam as proteínas Xpc de *C. albicans* (29% de identidade), Rad4p de *S. cerevisiae* (24,7%) e XPC de *H. sapiens* (28,6%) também apresentaram domínios pertencentes à superfamília Rad4 (**Figura 29**). Importante notar que a sequência de *XPC* de *C. neoformans* apresentou maior identidade com as sequências codificadoras das proteínas de *S. pombe*, *C. albicans* e *H. sapiens*, em comparação com a proteína Rad4 de *S. cerevisiae*.

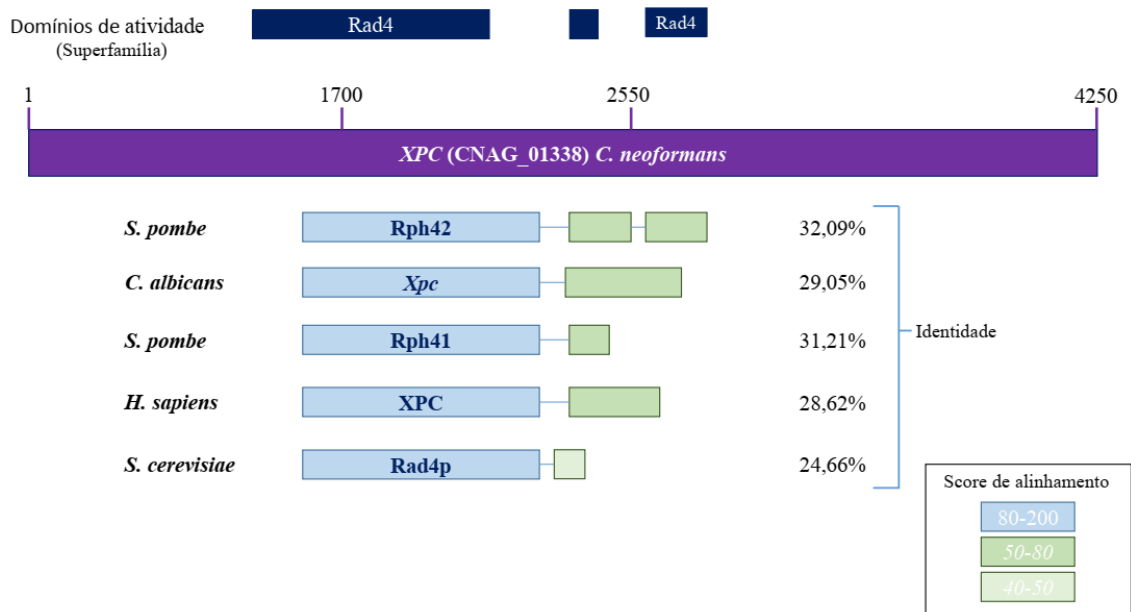


Figura 29. Representação do alinhamento de sequências XPC/Rad4. Os alinhamentos foram gerados no programa Blastx usando a sequência CNAG_01338 como entrada, contra os genomas de *C. albicans*, *S. pombe*, *H. sapiens* e *S. cerevisiae*. Os resultados foram representados conforme o score de alinhamento. A superfamília Rad4 foi o domínio de atividade presente na sequência XPC de *C. neoformans*. Os domínios Rad4 estão representados conforme posicionamento na sequência de XPC de *C. neoformans*.

7.2. O mutante *xpc* Δ apresenta sensibilidade à drogas genotóxicas e ao estresse oxidativo.

Para avaliar a importância do gene *XPC/Rad4* na virulência de *C. neoformans*, foi gerada uma cepa mutante, conforme executado para os demais genes já descritos neste trabalho (ver materiais e métodos). O mutante *xpc* Δ foi viável e submetido à análise de fenótipos e sensibilidade a drogas genotóxicas. Os resultados são apresentados na **Figura 30** e demonstram aumento da sensibilidade à estresse osmótico induzido por KCl e NaCl (1,5 M) (**Figura 30A**). Ensaio com outros agentes estressores como caféina, sorbitol e congo red foram realizados, contudo, não foi visualizada diferença significativa no crescimento entre as linhagens selvagens e mutantes. Fungos *xpc* Δ foram sensíveis aos tratamentos com as drogas alquilantes MMS e EMS (0,03%), e ao estresse replicativo induzido por HU (200 mM) (**Figura 30A**).

Para avaliar se a sensibilidade observada em meio sólido seria reproduzida nos tratamentos em meio líquido, células das linhagens mutantes *xpc* Δ e selvagem foram tratadas com MMS, EMS e o antibiótico genotóxico Zeocina por 1 h, e a sobrevivência quantificada por contagem de UFC. A deleção de *XPC* induz sensibilidade a todos os agentes testados em meio líquido, sendo os mutantes 50% mais sensíveis ao tratamento com Zeocina, quando comparado à linhagem selvagem (**Figura 30B**).

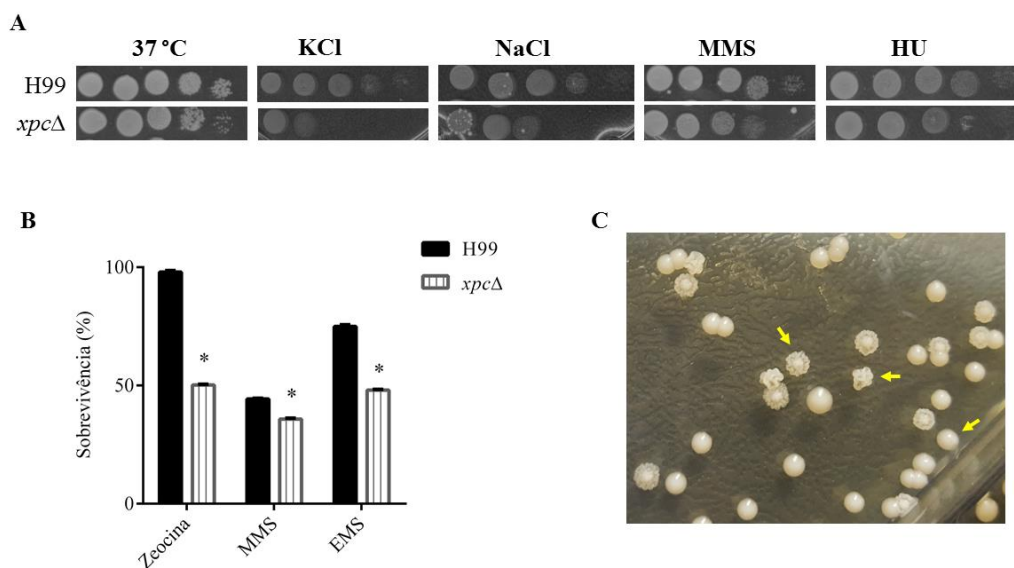


Figura 30. O mutante *xpcΔ* apresenta fenótipo alterado em resposta ao estresse osmótico e genotóxico. **A)** As células foram serialmente diluídas e pipetadas em meio YPD sólido contendo KCl 1,5 M; NaCl 1,5 M; MMS 0,03%; HU 100 mM e cultivadas durante 48h a 30° C. **B)** Quantificação da porcentagem de sobrevivência das linhagens após tratamento com Zeocina 0,08%; MMS 0,03% e EMS 0,034%. A contagem de UFC foi realizada e a porcentagem de sobrevivência calculada em relação a contagem de UFC em meio sem estressor e com estressor, dentro de cada linhagem. A linhagem H99 foi usada como controle. **C)** Sessão de placa de UFC obtida após incubação da linhagem *xpcΔ* com a droga Zeocina 0,08%. Setas amarelas indicam tipos diferentes de morfologia de colônia observados. Teste estatístico T-student. *denota $p < 0.01$. Experimento representativo de triplicata.

Importante salientar a presença de heterogeneidade na morfologia das colônias formadas por fungos da linhagem *xpcΔ*. Mesmo em condições de crescimento normais (YPD sem agentes estressores), foi possível observar a formação de colônias irregulares, caracterizadas por formato arredondado, centro homogêneo e extremidades enrugadas. Após tratamento com Zeocina 0,08%, a frequência das colônias heterogêneas aumentou visualmente, além de apresentarem conformações diferentes (**Figura 30C**). Como observado na **Figura 30 (C)**, foi detectada a formação de três tipos básicos conformação de colônias, indicados pelas setas amarelas. Esse fenótipo foi observado ao longo das replicatas experimentais, em frequências diferentes.

7.3. O Mutante *xpcΔ* apresenta sensibilidade ao estresse oxidativo

Em seguida, o mutante *xpcΔ* foi avaliado quanto à sensibilidade a agentes indutores de estresse oxidativo. Os agentes estressores H_2O_2 , MND foram usados para avaliação dos fenótipos de sensibilidade. Os mutantes *xpcΔ* apresentaram resistência ao tratamento com 5 mM de H_2O_2 e sensibilidade ao tratamento com 300 μ M de MND, em meio sólido a 30 °C e 37 °C (**Figura 31**). O perfil de sensibilidade foi também avaliado

para tratamentos em meio YPD líquido contendo H₂O₂ (3 mM) e MND (100 μM) e o perfil observado foi de sensibilidade significativa ao tratamento com H₂O₂ (**Figura 31 B**). O tratamento com Menadiona, nas concentrações analisadas em meio líquido, não induziu diferenças fenotípicas no mutante *xpcΔ*.

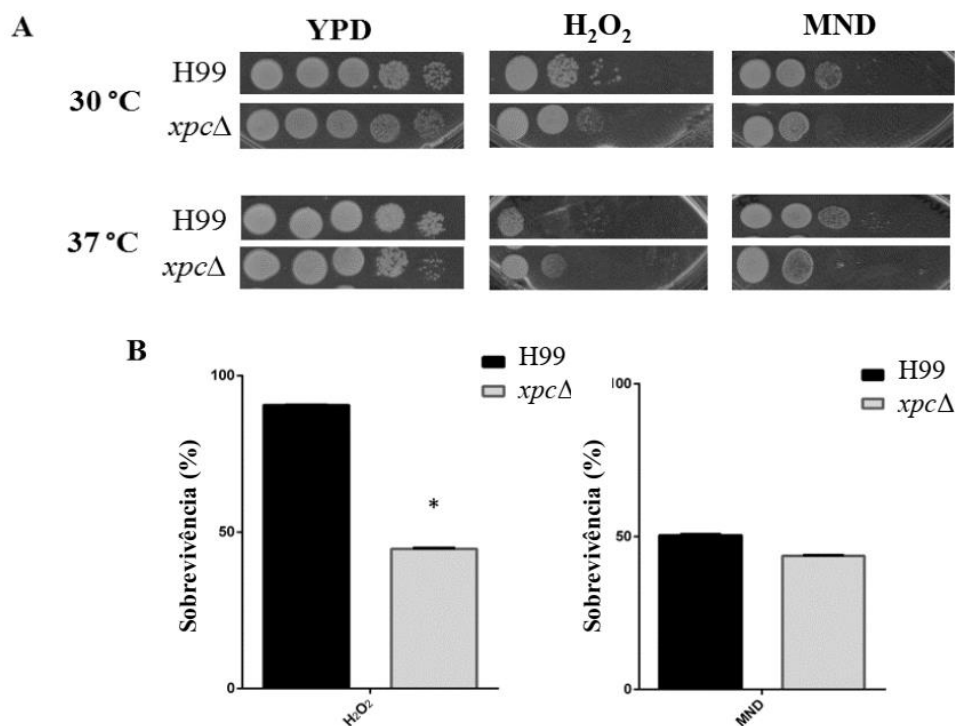


Figura 31. O mutante *xpcΔ* apresenta fenótipo alterado em resposta ao estresse oxidativo. **A)** As células das linhagens mutantes *xpcΔ* e selvagem foram serialmente diluídas e pipetadas em placas YPD contendo H₂O₂ 5 mM ou MND 300 uM. As placas foram incubadas em estufa 37 °C, por 48 h. Resultado representativo de três replicatas. **B)** Células foram incubadas em meio YPD líquido contendo H₂O₂ 3 mM ou MND 100 uM, a 37 °C, sob agitação por 1, e a sobrevivência medida por contagem de UFC. Teste estatístico *T-student*. *denota $p < 0.05$; barras de erro representam o desvio padrão da amostra. Experimento representativo de triplicata

O estresse oxidativo, como discutido no capítulo anterior deste trabalho, induz lesões características no DNA, as quais são prioritariamente reconhecidas pela via BER de reparo de DNA. Foi também comentado no capítulo anterior que existe a possibilidade de sobreposição das vias de reparo dependendo das situações celulares e condições de estresse a que o patógeno seja exposto. A proteína Rad4 é fator componente da via NER de reparo de DNA contudo, já foi associada às situações de estresse oxidativo em *C. neoformans*.

Em um estudo utilizando H₂O₂ como indutor de estresse oxidativo, Upadhyya e colaboradores demonstraram que alguns genes do sistema NER de reparo de DNA, como

RAD4, *RAD16* e *RAD7* foram continuamente induzidos na maior parte dos tempos de tratamento testados pelo grupo (Upadhyaya et al. 2013a). Neste estudo, os autores expuseram células fúngicas à 1mM de H₂O₂, em meio YNB ácido, e avaliaram a expressão desses genes após 5, 15, 30, 45 e 60 min de exposição, por meio de hibridização por microarranjos. A proteína Rad7 de *S. cerevisiae* apresenta função de ubiquitina ligase e sua interação com as proteínas Rad16 e Rad4 é crítica para a atividade de reparo por excisão de nucleotídeos dependente de proteassomo (Reed and Gillette 2007). O aumento dos níveis dos transcritos de Rad4, Rad16 e Rad7 em *C. neoformans* sugere que as proteínas possam estar envolvidas no reparo das lesões no DNA, induzidas por H₂O₂, de maneira dependente de proteassomo (Upadhyaya et al. 2013a). A via do proteossoma dependente da ubiquitina é um dos vários processos celulares que requerem ATP e é crítica para manter a homeostase celular. A ubiquitinação de proteínas é importante durante várias condições de estresse em leveduras e eucariotos superiores e, mais recentemente, demonstrou-se que a ubiquitinação de proteínas é importante para a resistência ao estresse, adaptação e virulência de *C. albicans* (Leach et al. 2011). Estudos em *C. neoformans* também demonstraram a importância do sistema de degradação proteassomal dependente de ubiquitina para a resposta ao estresse oxidativo (Ko et al. 2009).

Posteriormente, em 2010, Li e colaboradores demonstraram uma nova função de Rad4 / XPC na proteólise mediada por Ubiquitinação e proteassoma (Y. Li et al. 2010). Os autores descobriram que Rad4 e Rad23 compartilham vários substratos comuns. Os substratos nas células *rad4Δ* são ubiquitilados, indicando que Rad4 regula um evento de pós-ubiquitinação. O domínio de ligação de Rad4 é crucial para o funcionamento de Rad23 na degradação, sugerindo que Rad4 e Rad23 trabalham juntas na proteólise (Y. Li et al. 2010). Uma característica importante notada na pesquisa foi que após a exposição das células ao dano ao DNA, Rad4 ficou concentrada no núcleo e a degradação de seu substrato não-nuclear foi deficiente. Em humanos, a proteína XPC também se liga à proteína Ufd2 humano e regula a degradação do substrato UFD, sugerindo que a regulação proteolítica é uma característica conservada de Rad4/XPC (Y. Li et al. 2010).

Em *S. pombe*, o mutante *rad4.116*, além de ser sensível à radiação UV, também foi termosensível (Fenech et al. 1991). Os autores descobriram que a região N-terminal do produto do gene *RAD4* tem duas regiões de similaridade de sequência com a parte C-terminal do gene *XRCCI* humano, que foi clonado por Thompson et al. (Caldecott et al.

1995). O mutante *rad4.116* é extremamente sensível a MMS e EMS (cerca de 10 vezes mais sensível do que o tipo selvagem) e ligeiramente sensível (cerca de 2 vezes mais do que o tipo selvagem) à radiação ionizante e luz UV (Thompson et al. 1982). Além disso, células mutantes apresentaram um nível muito alto de trocas de cromátides irmãs e uma taxa reduzida de quebras de simples fita após o tratamento com radiação ionizante ou MMS (Thompson et al. 1982).

7.4. Deleção do gene *XPC* compromete a produção de fosfolipase mas não interfere no acúmulo de melanina em *C. neoformans*.

Para avaliar a relevância da via NER de reparo de DNA na expressão de atributos de virulência em *C. neoformans*, a produção de urease, fosfolipase e melanina pela linhagem *xpcΔ* foi avaliada. O mutante *xpcΔ* foi eficiente na produção de urease e melanina, apresentando fenótipo semelhante ao apresentado pela linhagem parental H99 (Figura 32 A). Foi observado que a produção de fosfolipase em meio de gema de ovo pelo mutante *xpcΔ* foi significativamente menor quando comparado à observada pela linhagem selvagem (Figura 32 B), demonstrando o comprometimento da produção e/ou eficiência da atividade enzimática no mutante NER.

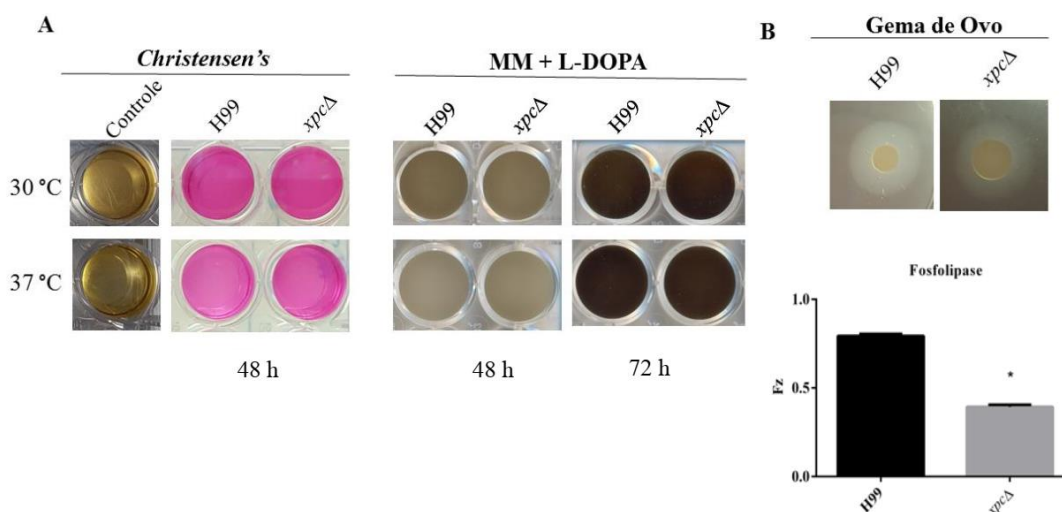


Figura 32. Deleção de *XPC* reduz a produção de fosfolipase mas não interfere na produção de melanina ou urease. **A)** As células foram cultivadas em meio *Christensen's* para análise da produção e atividade de urease (documentação após 48h de crescimento em meio indutor); e em meio mínimo (MM) suplementado com L-DOPA para avaliação da produção e acúmulo de melanina (documentação após 48 h e 72 h de crescimento em meio indutor). **B)** As células foram cultivadas durante 48h a 30 °C em meio ágar contendo gema de ovo como controle. A presença do halo translúcido ao redor da colônia indica atividade de fosfolipase (Pz). A Pz foi mensurada de acordo com (MF, ID, and LO 1982). Teste estatístico T-student. * $p < 0.01$; barras de erro representam o desvio padrão da amostra. Experimento representativo de triplicata.

A capacidade de produção de cápsula em condições de indução *in vitro* foi avaliada. As leveduras das diferentes linhagens foram incubadas em meio indutor de cápsula (MM + tiamina), a 30 °C e 37 °C e a produção da cápsula polissacarídica foi visualizada e quantificada através do método de exclusão de nanquim. Não foram detectadas diferenças significativas de tamanho da cápsula entre as linhagens mutantes para a via NER e a linhagem selvagem H99. O mutante *xpcΔ* apresentou aumento significativo no tamanho da célula quando incubado à 37 °C em meio indutor, mas sem apresentar aumento significativo no tamanho da cápsula (dados não mostrados).

7.5. Deleção do gene *XPC* não interfere no processo de fagocitose por macrófagos.

Para avaliar se a ausência do gene *XPC* induziria alterações no reconhecimento de *C. neoformans* por células de defesa do hospedeiro, foi realizado o ensaio de fagocitose por macrófagos. A suspensão contendo células fúngicas foi diluída e co-incubada com macrófagos diferenciados provenientes da medula de camundongos conforme protocolo descrito em Materiais e Métodos. Como resultado, observamos que os macrófagos M2 apresentaram porcentagem e índices de fagocitose semelhantes, independente da linhagem fúngica co-incubada. Os dados obtidos para cepas selvagem e mutante *xpcΔ* não apresentaram diferenças significativas (**Figura 33A e B**).

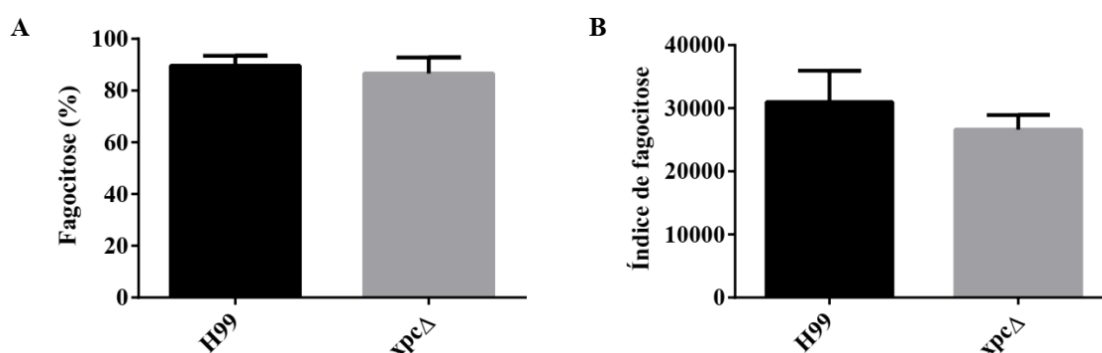


Figura 33. Deleção do gene *XPC* não interfere no processo de fagocitose por macrófagos. O experimento de fagocitose foi realizado conforme descrito na seção material e métodos. Não houve diferença significativa na porcentagem de fagocitose (A) ou índice de fagocitose (B) das linhagens selvagem e mutante *xpcΔ* por macrófagos M2, nas condições testadas.

Pesquisas mais recentes com *C. albicans* apresentaram que Rad4 é crítica na resposta mediada por Rad23 ao UV e tem funções semelhantes, regulando a morfogênese celular e a formação de biofilme, mas não desempenha um papel importante na virulência fúngica. Frente a isso, os autores concluíram que a supressão da virulência mediada por componentes da etapa de iniciação da via NER é mais atribuída a proteína Rad23, e não

à Rad4, e é provavelmente devida ao seu papel na degradação de proteínas, em vez da via NER em *C. albicans* (Feng et al., 2020).

A natureza multifuncional das proteínas de reparo tem um objetivo prático. O tráfego de proteínas no DNA é bastante pesado, com replicação e transcrição contínuas, o que exige uma dinâmica de exposição, enovelamento, leitura, checagem e correção de lesões muito eficaz. Em situações de danos ao DNA, as lesões exigem atenção imediata para evitar o bloqueio da transcrição e a instabilidade genômica (Pichiorri et al. 2008; Shiloh and Lehmann 2004). A velocidade no reparo é melhor atingida pela mobilização de proteínas existentes no núcleo, do que por meio da síntese *de novo* de proteínas para atender às demandas das reações de reparo. Uma vez que as lesões estejam corrigidas, as proteínas poderiam retomar suas funções normais, o que por sua vez facilitaria o acoplamento funcional do reparo do DNA com vários eventos celulares (Y. Li et al. 2010). Esse processo multifuncional é estabelecido e bem caracterizado nas proteínas de reparo de DNA de humanos, como na proteína APE1 (Evans, Limp-Foster, and Kelley 2000; M. Li and Wilson 2014a). A proteína APE1 humana apresenta multifunções na célula, atuando como regulador redox de fatores de transcrição no citoplasma, e participa do metabolismo de RNA e reparo de DNA no núcleo. A mesma proteína APE1 pode ser translocada do citoplasma ao núcleo através da exposição de um sinal de localização nuclear em sua sequência proteica, e posteriormente retornar ao citoplasma após correção das lesões e restauração do equilíbrio celular. Muito ainda precisa ser estudado e avaliado, contudo é possível que outras proteínas de reparo possam também apresentar atividades multifuncionais.

Nós demonstramos que o mutante *xpcΔ* apresentou redução significativa da produção de fosfolipase. Muitos fatores da via NER participam de outros eventos não relacionados ao reparo de DNA (Hanawalt 2003). Por exemplo, a proteína RPA (do inglês *Replication Protein A*), participa da via NER e é essencial para a replicação do DNA. Outro fator da via NER, o TFIIH, também é necessário para a transcrição dependente de RNA polimerase II. Todavia, a proteína Rad4 é considerada apenas uma proteína de reparo de DNA (Y. Li et al. 2010). Estudos em *Candida albicans* demonstraram a participação das proteínas RAD23 e RAD4 na manutenção da expressão de genes de fatores de virulência (Feng et al. 2020). Por meio de RNA-seq e qRT-PCR, os autores descobriram que RAD23 e RAD4 desempenham papéis críticos na manutenção dos níveis de expressão de vários genes relacionados à produção de fatores de virulência. Diante

deste resultado, os autores propuseram um modelo regulatório de Rad23 na resposta UV e virulência, onde Rad4 desempenha um papel crítico na resposta UV, enquanto apenas Rad23, mas não Rad4, desempenha um papel crítico na regulação da virulência, que pode depender da regulação da expressão genes chave como *SUN41* (Feng et al. 2020).

Verma et al., 2019 estudou o papel da proteínas Rad23 de *C. neoformans* (Verma, Shakya, and Idnurm 2019). Os autores observaram que a ausência de determinados domínios da proteína Rad23 influenciavam a transcrição de genes envolvidos na virulência de *C. neoformans* (Verma, Shakya, and Idnurm 2019). A caracterização de domínios específicos de Rad23 revelou que o domínio de ligação a XPC (Rad4) é necessário para resistência à radiação, mas dispensável para virulência. Em contraste, um domínio de ligação de ubiquitina em Rad23 é necessário para a virulência total ((Verma, Shakya, and Idnurm 2019), sugerindo que a função de reparo do DNA dessa proteína não é necessária para seu papel na virulência. Os resultados observados para a proteína Rad23 de *C. neoformans* e *C. albicans* são semelhantes, contudo, pouco se sabe sobre os papéis desempenhados pela proteína Rad4 de *C. neoformans*.

8. Discussão

O estudo das características moleculares dos microrganismos proporciona o conhecimento dos mecanismos celulares que regem as manifestações fenotípicas de interesse médico global, como a produção de atributos de virulência e mecanismos de resistência a estresses e drogas (Sullivan et al. 1996; S. P. Brown, Cornforth, and Mideo 2012). Quando analisado sob o prisma dos patógenos oportunistas, a dinâmica de respostas ao ambiente se torna ainda mais complexa, diante da heterogeneidade das condições à que são expostos os microrganismos em suas diferentes fases do ciclo de vida. O patógeno oportunista humano *C. neoformans* é considerado um fungo de grande importância para a saúde mundial (McDonald, Wiesner, and Nielsen 2012; Nosanchuk, Stark, and Casadevall 2015). A adaptação de *C. neoformans* aos diferentes ambientes e climas ao redor do mundo é responsável também pela eficiência do microrganismo em infectar hospedeiros em um mesmo ciclo de vida (D. L. Goldman et al. 1998). As bases genéticas e moleculares da dinâmica de sobrevivência dos patógenos em contato com os hospedeiros explicitam a importância dos mecanismos de controle da expressão gênica, do reparo de DNA e da sinalização de danos celulares para o estabelecimento das infecções.

Neste trabalho foram identificadas e caracterizadas as enzimas Ap-endonucleases de *C. neoformans*. Foi examinado o papel do sistema BER de reparo de DNA na sobrevivência e resposta a drogas genotóxicas deste patógeno. Foram identificados dois genes que codificam sequências preditas como sendo referentes à Apns no genoma de *C. neoformans*. Um ponto importante a ser discutido é a diferença nos fenótipos apresentados pelos mutantes *apn1Δ* e *apn2Δ*, apesar dos genes serem, à princípio, redundantes na via BER. As diferenças entre os domínios de sequência CnApn1 e CnApn2 são provavelmente a razão para as diferenças consistentes entre os fenótipos apresentados pelos mutantes Apn em resposta a condições de estresse. Apn1 possui apenas um domínio de endonuclease AP e os mutantes *apn1Δ* apresentaram, em geral, fenótipos semelhantes à cepa selvagem. Apenas a resposta dose-dependente a doses mais baixas de radiação UV, e fenótipos de co-exposição H₂O₂ + MX foram específicos para *apn1Δ*.

A resistência a doses menores de radiação UV observada na cepa mutante *apn1Δ* pode estar associada à redução da clivagem do DNA realizada por Apn1. A ausência de Apn1 poderia reduzir a clivagem de sítios AP no DNA (lesão induzida por radiação UV) e, conseqüentemente, a formação quebras nas ligações fosfodiéster do DNA, na cepa mutante. Esse mecanismo pode ser associado aos dados observados na **Figura 18**, quando os mutantes *apn2Δ* apresentaram um fenótipo selvagem em resposta a H₂O₂ + MX 3 mM, uma combinação que induz a oxidação de bases e sítios AP no DNA. A cepa mutante *apn2Δ* ainda possui proteínas Apn1 ativas, cuja atividade pode ser suficiente para manter o fenótipo parental na cepa mutante *apn2Δ*.

Por outro lado, a proteína Apn2 possui domínios envolvidos em processos biológicos que vão além do reparo de DNA. A linhagem *apn2Δ* foi mais susceptível à radiação UV, alcição, e aos estresses induzidos por antibióticos e agentes oxidantes. Apn2 também foi listada como um fator de transcrição, então é possível que alguns dos fenótipos distintos apresentados pelo mutante *apn2Δ* resulte da ausência da atividade transcricional de Apn2. No geral, a linhagem *apn1Δapn2Δ* apresentou fenótipos semelhantes ao observado para o mutante *apn2*, exceto no padrão de fragmentação do DNA em resposta à Zeocina e o perfil de sensibilidade à H₂O₂ e MX. Os fenótipos observados para o duplo mutante nem sempre correspondem ao padrão apresentado pelos mutantes simples (de genes individuais), ou à um efeito sinérgico pela deleção conjunta dos dois genes. Desta

maneira, é importante notar que a linhagem *apn1Δapn2Δ* possui mecanismos específicos de resposta celular ao estresse.

A princípio, a via BER de reparo de DNA não é a via responsável prioritariamente por reparos de lesões causadas pela Zeocina. Contudo, os resultados apresentados neste trabalho demonstram a alta sensibilidade dos mutantes BER ao tratamento com Zeocina, mesmo em baixas concentrações, o que abre possibilidade da participação das enzimas AP-endonucleases em vias além da excisão de bases. Esse achado é ainda reforçado pelo padrão de sensibilidade à radiação UV, geradora de lesões alçilantes volumosas, comumente corrigidas pela via NER de reparo de DNA. Estudos vastos relatam a sobreposição das enzimas das vias de reparo nas mais diversas atividades celulares em vários organismos (Fenech et al. 1991; Tishkoff et al. 1997; Pichiorri et al. 2008; Jung et al. 2016a; Palmer et al. n.d.; Yasui 2013). Esse conhecimento pode ser aplicado ao *C. neoformans*, conforme observado neste estudo. Nesse sentido, é possível que as enzimas *Apn* de *C. neoformans* possam atuar em atividade características de etapas de vias de reparo como a incisão na via NER ou na clivagem da fosfodiéster em DSBR.

9. Conclusão

Neste trabalho foram apresentados resultados que demonstram a importância do estudo e caracterização de enzimas de reparo de DNA para a resposta de *C. neoformans* às alterações do ambiente. Nós demonstramos que a regulação dos sistemas de reparo de DNA por excisão de bases (BER) e de nucleotídeos (NER) tem impacto no funcionamento celular em resposta à diferentes tipos de condições de estresse, desde o estresse oxidativo, até o estresse causado por exposição à agentes antibióticos. A modulação do reparo de DNA por excisão de bases tem impacto direto na produção e acúmulo de melanina por *C. neoformans*, e esse impacto tem característica irreversível com a incubação com Metoxiamina, um inibidor sintético da via BER de reparo de DNA. Esse resultado demonstra a importância direta do reparo de sítios abásicos no DNA para a expressão de um atributo de virulência por *C. neoformans*. Foi demonstrado também, que a exposição de fungos da linhagem selvagem e mutante BER à Metoxiamina apresentou resultados sinérgicos quando utilizada junto ao antibiótico Anfotericina B, aumentando significativamente o efeito fungicida da droga. Foi apresentado que a proteína XPC/Rad4 também tem papel importante na produção de fosfolipase e na resposta ao estresse oxidativo induzido por H₂O₂, provavelmente em decorrência de uma atividade junto ao sistema de degradação proteassomal dependente de ubiquitinação.

Juntos esses dados suportam a possível atividade multifuncional das proteínas de reparo de DNA, além da relação existente entre o reparo de DNA e os mecanismos de sobrevivência e virulência de *C. neoformans*.

10. Referências

- Aboussekhra, A, M Biggerstaff, M K Shivji, J A Vilpo, V Moncollin, V N Podust, M Protić, U Hübscher, J M Egly, and R D Wood. 1995. "Mammalian DNA Nucleotide Excision Repair Reconstituted with Purified Protein Components." *Cell* 80 (6): 859–68.
- Adam, Salomé, Juliette Dabin, and Sophie E. Polo. 2015. "Chromatin Plasticity in Response to DNA Damage: The Shape of Things to Come." *DNA Repair* 32 (August): 120–26. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2015.04.022>.
- Agnez-Lima, Lucymara F, Julliane T A Melo, Acarízia E Silva, Ana Helena S Oliveira, Ana Rafaela S Timoteo, Keronninn M Lima-Bessa, Glaucia R Martinez, et al. 2012. "DNA Damage by Singlet Oxygen and Cellular Protective Mechanisms." *Mutation Research*, January. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.12.005>.
- Alanio, Alexandre, Marie Desnos-Ollivier, and Françoise Dromer. 2011. "Dynamics of Cryptococcus Neoformans-Macrophage Interactions Reveal That Fungal Background Influences Outcome during Cryptococcal Meningoencephalitis in Humans." *MBio* 2 (4): e00158-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00158-11>.
- Alexander, Angela, Jinhee Kim, and Cheryl L Walker. 2010. "ATM Engages the TSC2/MTORC1 Signaling Node to Regulate Autophagy." *Autophagy* 6 (5): 672–73. <https://doi.org/10.4161/auto.6.5.12509>.
- Alseth, I., Fikret Osman, Hanne Korvald, Irina Tsaneva, Matthew C Whitby, Erling Seeberg, and Magnar Bjørås. 2005. "Biochemical Characterization and DNA Repair Pathway Interactions of Mag1-Mediated Base Excision Repair in Schizosaccharomyces Pombe." *Nucleic Acids Research* 33 (3): 1123–31. <https://doi.org/10.1093/nar/gki259>.
- Altamirano, Sophie, Diana Fang, Charles Simmons, Shreyas Sridhar, Peipei Wu, Kaustuv Sanyal, and Lukasz Kozubowski. 2017. "Fluconazole-Induced Ploidy Change in Cryptococcus Neoformans Results from the Uncoupling of Cell Growth and Nuclear Division." *MSphere* 2 (3). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00205-17>.
- Amente, S, A Bertoni, A Morano, L Lania, E V Avvedimento, and B Majello. 2010. "LSD1-Mediated Demethylation of Histone H3 Lysine 4 Triggers Myc-Induced Transcription." *Oncogene* 29 (25): 3691–3702. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.120>.
- Aravind, L, D R Walker, and E V Koonin. 1999. "Conserved Domains in DNA Repair Proteins and Evolution of Repair Systems." *Nucleic Acids Research* 27 (5): 1223–42. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=148307&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- B, Demple, and Harrison L. 1994. "Repair of Oxidative Damage to DNA: Enzymology and Biology." *Annual Review of Biochemistry* 63. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BI.63.070194.004411>.
- Ba, Xueqing, Attila Bacsi, Jixian Luo, Leopoldo Aguilera-Aguirre, Xianlu Zeng, Zsolt Radak, Allan R Brasier, and Istvan Boldogh. 2014. "8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1 Augments Proinflammatory Gene Expression by Facilitating the

- Recruitment of Site-Specific Transcription Factors.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192 (5): 2384–94. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302472>.
- Bauernfeind, Franz, and Veit Hornung. 2013. “Of Inflammasomes and Pathogens--Sensing of Microbes by the Inflammasome.” *EMBO Molecular Medicine* 5 (6): 814–26. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201771>.
- BD, Wallace, Berman Z, Mueller GA, Lin Y, Chang T, Andres SN, Wojtaszek JL, et al. 2017. “APE2 Zf-GRF Facilitates 3’-5’ Resection of DNA Damage Following Oxidative Stress.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (2). <https://doi.org/10.1073/PNAS.1610011114>.
- Belfield, Carrie, Craig Queenan, Hui Rao, Kenji Kitamura, and Nancy C. Walworth. 2014. “The Oxidative Stress Responsive Transcription Factor Pap1 Confers DNA Damage Resistance on Checkpoint-Deficient Fission Yeast Cells.” Edited by Deanna M. Koepf. *PLoS ONE* 9 (2): e89936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089936>.
- Bennett, Richard A. O. 1999. “The *Saccharomyces Cerevisiae* ETH1 Gene, an Inducible Homolog of Exonuclease III That Provides Resistance to DNA-Damaging Agents and Limits Spontaneous Mutagenesis.” *Molecular and Cellular Biology* 19 (3): 1800–1809. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.3.1800>.
- Bhakat, Kishor K, Anil K Mantha, Sankar Mitra, and Bhakat E T Al. 2009. “An Essential Multifunctional Protein” 11 (3). <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2198>.
- Bicanic, Tihana, and Thomas S Harrison. 2004. “Cryptococcal Meningitis.” *British Medical Bulletin* 72: 99–118. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldh043>.
- Billmyre, R Blake, Shelly Applen Clancey, and Joseph Heitman. 2017. “Natural Mismatch Repair Mutations Mediate Phenotypic Diversity and Drug Resistance in *Cryptococcus Deuterogattii*.” *ELife* 6 (September). <https://doi.org/10.7554/eLife.28802>.
- BL, Gómez, and Nosanchuk JD. 2003. “Melanin and Fungi.” *Current Opinion in Infectious Diseases* 16 (2). <https://doi.org/10.1097/00001432-200304000-00005>.
- Bloom, Amanda L M, Richard M Jin, Jay Leipheimer, Jonathan E Bard, Donald Yergeau, Elizabeth A Wohlfert, and John C Panepinto. 2019. “Thermotolerance in the Pathogen *Cryptococcus Neoformans* Is Linked to Antigen Masking via mRNA Decay-Dependent Reprogramming.” *Nature Communications* 10 (1): 4950. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12907-x>.
- Boiteux, Serge, Lionel Gellon, and Nathalie Guibourt. 2002. “Repair of 8-Oxoguanine in *Saccharomyces Cerevisiae*: Interplay of DNA Repair and Replication Mechanisms.” *Free Radical Biology & Medicine* 32 (12): 1244–53. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00822-5](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00822-5).
- Boiteux, Serge, and Marie Guillet. 2004a. “Abasic Sites in DNA: Repair and Biological Consequences in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *DNA Repair* 3 (1): 1–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14697754>.
- . 2004b. “Abasic Sites in DNA: Repair and Biological Consequences in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *DNA Repair* 3 (1): 1–12.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14697754>.
- . 2004c. “Abasic Sites in DNA: Repair and Biological Consequences in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *DNA Repair* 3 (1): 1–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14697754>.
- . 2006. “Use of Yeast for Detection of Endogenous Abasic Lesions, Their Source, and Their Repair.” *Methods in Enzymology* 408 (January): 79–91. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)08006-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)08006-2).
- Boiteux, Serge, and Sue Jinks-Robertson. 2013a. “DNA Repair Mechanisms and the Bypass of DNA Damage in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Genetics* 193 (4): 1025. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.112.145219>.
- . 2013b. “DNA Repair Mechanisms and the Bypass of DNA Damage in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Genetics* 193 (4): 1025–64. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.145219>.
- Bowman, K K, K Sidik, C A Smith, J S Taylor, P W Doetsch, and G A Freyer. 1994. “A New ATP-Independent DNA Endonuclease from *Schizosaccharomyces Pombe* That Recognizes Cyclobutane Pyrimidine Dimers and 6-4 Photoproducts.” *Nucleic Acids Research* 22 (15): 3026–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8065916>.
- Boyce, Kylie J., Yina Wang, Surbhi Verma, Viplendra P. S. Shakya, Chaoyang Xue, and Alexander Idnurm. 2017. “Mismatch Repair of DNA Replication Errors Contributes to Microevolution in the Pathogenic Fungus *Cryptococcus Neoformans*.” *MBio* 8 (3). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00595-17>.
- Boyce, Kylie J, Chengjun Cao, Chaoyang Xue, and Alexander Idnurm. 2020. “A Spontaneous Mutation in DNA Polymerase POL3 during in Vitro Passaging Causes a Hypermutator Phenotype in *Cryptococcus* Species.” *DNA Repair* 86 (February): 102751. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102751>.
- Brandão, Fabiana, Shannon K. Esher, Kyla S. Ost, Kaila Pianalto, Connie B. Nichols, Larissa Fernandes, Anamélia L. Bocca, Marcio José Poças-Fonseca, and J. Andrew Alspaugh. 2018. “HDAC Genes Play Distinct and Redundant Roles in *Cryptococcus Neoformans* Virulence.” *Scientific Reports* 8 (1): 5209. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21965-y>.
- Brown, A. J. P., S. Budge, D. Kaloriti, A. Tillmann, M. D. Jacobsen, Z. Yin, I. V. Ene, et al. 2013. “Stress Adaptation in a Pathogenic Fungus.” *Journal of Experimental Biology* 217 (1): 144–55. <https://doi.org/10.1242/jeb.088930>.
- Brown, Sam P, Daniel M Cornforth, and Nicole Mideo. 2012. “Evolution of Virulence in Opportunistic Pathogens: Generalism, Plasticity, and Control.” *Trends in Microbiology* 20 (7): 336–42. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.005>.
- Brunke, Sascha, Katja Seider, Daniel Fischer, Ilse D Jacobsen, Lydia Kasper, Nadja Jablonowski, Anja Wartenberg, et al. 2014. “One Small Step for a Yeast - Microevolution within Macrophages Renders *Candida Glabrata* Hypervirulent Due to a Single Point Mutation.” *PLoS Pathogens* 10 (10): e1004478. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004478>.
- Burkovics, P., V. Szukacsov, I. Unk, and L. Haracska. 2006. “Human Ape2 Protein Has a 3’-5’ Exonuclease Activity That Acts Preferentially on Mismatched Base Pairs.”

- Nucleic Acids Research* 34 (9): 2508–15. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl259>.
- Byrnes, Edmond J 3rd, Karen H Bartlett, John R Perfect, and Joseph Heitman. 2011. “Cryptococcus Gattii: An Emerging Fungal Pathogen Infecting Humans and Animals.” *Microbes and Infection* 13 (11): 895–907. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.05.009>.
- Cagney, Gerard, David Alvaro, Robert JD Reid, Peter H Thorpe, Rodney Rothstein, and Nevan J Krogan. 2006. “Functional Genomics of the Yeast DNA-Damage Response.” *Genome Biology* 7 (9): 233. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-9-233>.
- Caldecott, K W, J D Tucker, L H Stanker, and L H Thompson. 1995. “Characterization of the XRCC1-DNA Ligase III Complex in Vitro and Its Absence from Mutant Hamster Cells.” *Nucleic Acids Research* 23 (23): 4836—4843. <https://doi.org/10.1093/nar/23.23.4836>.
- Casadevall, Arturo. 2007. “Determinants of Virulence in the Pathogenic Fungi.” *Fungal Biology Reviews* 21 (4): 130. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.02.007>.
- Casadevall, Arturo, and Liise anne Pirofski. 2001. “Host-Pathogen Interactions: The Attributes of Virulence.” *Journal of Infectious Diseases* 184 (3): 337–44. <https://doi.org/10.1086/322044>.
- Chalissery, Jisha, Deena Jalal, Zeina Al-Natour, and Ahmed H. Hassan. 2017. “Repair of Oxidative DNA Damage in Saccharomyces Cerevisiae.” *DNA Repair* 51 (March): 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.12.010>.
- Chankova, S G, E Dimova, M Dimitrova, and P E Bryant. 2007. “Induction of DNA Double-Strand Breaks by Zeocin in Chlamydomonas Reinhardtii and the Role of Increased DNA Double-Strand Breaks Rejoining in the Formation of an Adaptive Response.” *Radiation and Environmental Biophysics* 46 (4): 409–16. <https://doi.org/10.1007/s00411-007-0123-2>.
- Charret, Karen S, Cristina E Requena, Víctor M Castillo-Acosta, Luis M Ruiz-Pérez, Dolores González-Pacanowska, and Antonio E Vidal. 2012. “Trypanosoma Brucei AP Endonuclease 1 Has a Major Role in the Repair of Abasic Sites and Protection against DNA-Damaging Agents.” *DNA Repair* 11 (1): 53–64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.10.006>.
- Chauhan, Neeraj, Toni Ciudad, Ane Rodríguez-Alejandre, Germán Larriba, Richard Calderone, and Encarnación Andaluz. 2005. “Virulence and Karyotype Analyses of Rad52 Mutants of Candida Albicans: Regeneration of a Truncated Chromosome of a Reintegrant Strain (Rad52/RAD52) in the Host.” *Infection and Immunity* 73 (12): 8069–78. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8069-8078.2005>.
- Chauhan, Neeraj, Jean-Paul Latge, and Richard Calderone. 2006. “Signalling and Oxidant Adaptation in Candida Albicans and Aspergillus Fumigatus.” *Nature Reviews Microbiology* 4 (6): 435–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1426>.
- Chen, Xuejing, Yogambigai Velmurugu, Guanqun Zheng, Beomseok Park, Yoonjung Shim, Youngchang Kim, Lili Liu, et al. 2015. “Kinetic Gating Mechanism of DNA Damage Recognition by Rad4/XPC.” *Nature Communications* 6 (January): 5849. <https://doi.org/10.1038/ncomms6849>.
- Chen, Yuan, Rhys A. Farrer, Charles Giamberardino, Sharadha Sakthikumar, Alexander

- Jones, Timothy Yang, Jennifer L. Tenor, et al. 2017. "Microevolution of Serial Clinical Isolates of *Cryptococcus Neoformans* Var. *Grubii* and *C. Gattii*." Edited by Françoise Dromer. *MBio* 8 (2): e00166-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00166-17>.
- Collura, Ada, Patricia Auffret Van Der Kemp, and Serge Boiteux. 2012. "Abasic Sites Linked to DUTP Incorporation in DNA Are a Major Cause of Spontaneous Mutations in Absence of Base Excision Repair and Rad17–Mec3–Ddc1 (9–1–1) DNA Damage Checkpoint Clamp in *Saccharomyces Cerevisiae*." *DNA Repair* 11 (3): 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.12.004>.
- Cooke, Marcus S, Mark D Evans, Miral Dizdaroglu, and Joseph Lunec. 2003. "Oxidative DNA Damage: Mechanisms, Mutation, and Disease." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (10): 1195–1214. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>.
- Cooney, Nicole M, and Bruce S Klein. 2008. "Fungal Adaptation to the Mammalian Host: It Is a New World, after All." *Current Opinion in Microbiology* 11 (6): 511–16. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.018>.
- Dadachova, Ekaterina, and Arturo Casadevall. 2008. "Ionizing Radiation: How Fungi Cope, Adapt, and Exploit with the Help of Melanin." *Current Opinion in Microbiology* 11 (6): 525–31. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.013>.
- Djordjevic, Julianne Teresa. 2010. "Role of Phospholipases in Fungal Fitness, Pathogenicity, and Drug Development - Lessons from *Cryptococcus Neoformans*." *Frontiers in Microbiology* 1 (NOV): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00125>.
- Drapkin, R, J T Reardon, A Ansari, J C Huang, L Zawel, K Ahn, A Sancar, and D Reinberg. 1994. "Dual Role of TFIIF in DNA Excision Repair and in Transcription by RNA Polymerase II." *Nature* 368 (6473): 769–72. <https://doi.org/10.1038/368769a0>.
- Eisen, J A, and P C Hanawalt. 1999. "A Phylogenomic Study of DNA Repair Genes, Proteins, and Processes." *Mutation Research* 435 (3): 171–213. [https://doi.org/10.1016/s0921-8777\(99\)00050-6](https://doi.org/10.1016/s0921-8777(99)00050-6).
- Esher, Shannon K, Oscar Zaragoza, and James Andrew Alspaugh. 2018. "Cryptococcal Pathogenic Mechanisms: A Dangerous Trip from the Environment to the Brain." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 113 (7). <https://doi.org/10.1590/0074-02760180057>.
- Evans, A R, M Limp-Foster, and M R Kelley. 2000. "Going APE over Ref-1." *Mutation Research* 461 (2): 83–108. [https://doi.org/10.1016/s0921-8777\(00\)00046-x](https://doi.org/10.1016/s0921-8777(00)00046-x).
- Evert, Barbara A, Tiffany B Salmon, Binwei Song, Liu Jingjing, Wolfram Siede, and Paul W Doetsch. 2004. "Spontaneous DNA Damage in *Saccharomyces Cerevisiae* Elicits Phenotypic Properties Similar to Cancer Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (21): 22585–94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400468200>.
- Feder, Vanessa, Livia Kmetzsch, Charley Christian Staats, Natalia Vidal-Figueiredo, Rodrigo Ligabue-Braun, Célia Regina Carlini, and Marilene Henning Vainstein. 2015. "Cryptococcus Gattii Urease as a Virulence Factor and the Relevance of Enzymatic Activity in Cryptococcosis Pathogenesis." *The FEBS Journal* 282 (8): 1406–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/febs.13229>.

- Fenech, M, A M Carr, J Murray, F Z Watts, and A R Lehmann. 1991. "Cloning and Characterization of the Rad4 Gene of *Schizosaccharomyces Pombe*; a Gene Showing Short Regions of Sequence Similarity to the Human XRCC1 Gene." *Nucleic Acids Research* 19 (24): 6737–41. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6737>.
- Feng, Jia, Shuangyan Yao, Yansong Dong, Jing Hu, Malcolm Whiteway, and Jinrong Feng. 2020. "Nucleotide Excision Repair Protein Rad23 Regulates Cell Virulence Independent of Rad4 in *Candida Albicans*." *MSphere* 5 (1). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00062-20>.
- Fenske, Timothy S, Christine McMahon, Deepa Edwin, Joseph C Jarvis, James M Cheverud, Matthew Minn, Vikram Mathews, et al. 2006. "Identification of Candidate Alkylator-Induced Cancer Susceptibility Genes by Whole Genome Scanning in Mice." *Cancer Research* 66 (10): 5029–38. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3404>.
- Ferreira, G. F., L. d. M. Baltazar, J. R. A. Santos, A. S. Monteiro, L. A. d. O. Fraga, M. A. Resende-Stoianoff, and D. A. Santos. 2013. "The Role of Oxidative and Nitrosative Bursts Caused by Azoles and Amphotericin B against the Fungal Pathogen *Cryptococcus Gattii*." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (8): 1801–11. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt114>.
- Fleming, Aaron M., Yun Ding, and Cynthia J. Burrows. 2017. "Oxidative DNA Damage Is Epigenetic by Regulating Gene Transcription via Base Excision Repair." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (10): 2604–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619809114>.
- Forche, A., D. Abbey, T. Pisithkul, M. A. Weinzierl, T. Ringstrom, D. Bruck, K. Petersen, and J. Berman. 2011. "Stress Alters Rates and Types of Loss of Heterozygosity in *Candida Albicans*." *MBio* 2 (4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00129-11>.
- Fortini, Paola, and Eugenia Dogliotti. 2007. "Base Damage and Single-Strand Break Repair: Mechanisms and Functional Significance of Short- and Long-Patch Repair Subpathways." *DNA Repair* 6 (4): 398–409. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.008>.
- Fousteri, Maria, and Leon H F Mullenders. 2008. "Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells: Molecular Mechanisms and Biological Effects." *Cell Research* 18 (1): 73–84. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.6>.
- Fries, B C, and A Casadevall. 1998. "Serial Isolates of *Cryptococcus Neoformans* from Patients with AIDS Differ in Virulence for Mice." *The Journal of Infectious Diseases* 178 (6): 1761–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815230>.
- Fung, Hua, and Bruce Demple. 2005. "A Vital Role for Ape1/Ref1 Protein in Repairing Spontaneous DNA Damage in Human Cells." *Molecular Cell* 17 (3): 463–70. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.12.029>.
- G, Tell, Quadrifoglio F, Tiribelli C, and Kelley MR. 2009. "The Many Functions of APE1/Ref-1: Not Only a DNA Repair Enzyme." *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (3). <https://doi.org/10.1089/ARS.2008.2194>.
- García-Rodas, Rocío, Arturo Casadevall, Juan Luís Rodríguez-Tudela, Manuel Cuenca-Estrella, and Oscar Zaragoza. 2011a. "Cryptococcus Neoformans Capsular Enlargement and Cellular Gigantism during *Galleria Mellonella* Infection." *PLoS*

- One* 6 (9): e24485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024485>.
- . 2011b. “Cryptococcus Neoformans Capsular Enlargement and Cellular Gigantism during Galleria Mellonella Infection.” Edited by Robert A. Cramer. *PLoS ONE* 6 (9): e24485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024485>.
- Geacintov, Nicholas E, and Suse Broyde. 2017. “Repair-Resistant DNA Lesions.” *Chemical Research in Toxicology* 30 (8): 1517–48. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00128>.
- Gillet, Ludovic C J, and Orlando D Schärer. 2006. “Molecular Mechanisms of Mammalian Global Genome Nucleotide Excision Repair.” *Chemical Reviews* 106 (2): 253–76. <https://doi.org/10.1021/cr040483f>.
- Glassner, B J, L J Rasmussen, M T Najarian, L M Posnick, and L D Samson. 1998. “Generation of a Strong Mutator Phenotype in Yeast by Imbalanced Base Excision Repair.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (17): 9997–10002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9707589>.
- Goldman, David L., Bettina C. Fries, Sarah P. Franzot, Lya Montella, and Arturo Casadevall. 1998. “Phenotypic Switching in the Human Pathogenic Fungus *Cryptococcus Neoformans* Is Associated with Changes in Virulence and Pulmonary Inflammatory Response in Rodents.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (25).
- Goldman, Gustavo H., Sarah Lea McGuire, and Steven D. Harris. 2002. “The DNA Damage Response in Filamentous Fungi.” *Fungal Genetics and Biology* 35 (3): 183–95. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2002.1344>.
- Guerreiro, Patrícia S, Ana Sofia Fernandes, João G Costa, Matilde Castro, Joana P Miranda, and Nuno G Oliveira. 2013. “Differential Effects of Methoxyamine on Doxorubicin Cytotoxicity and Genotoxicity in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells.” *Mutation Research* 757 (2): 140–47. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.08.003>.
- Guillet, Marie, and Serge Boiteux. 2002. “Endogenous DNA Abasic Sites Cause Cell Death in the Absence of Apn1, Apn2 and Rad1/Rad10 in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *The EMBO Journal* 21 (11): 2833–41. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2833>.
- Gurkan-Cavusoglu, Evren, Sriya Avadhani, Lili Liu, Timothy J Kinsella, and Kenneth A Loparo. 2013. “Developing an in Silico Model of the Modulation of Base Excision Repair Using Methoxyamine for More Targeted Cancer Therapeutics.” *IET Systems Biology* 7 (2): 27–37. <https://doi.org/10.1049/iet-syb.2011.0045>.
- Guzder, S. N., V. Bailly, P. Sung, L. Prakash, and S. Prakash. 1995. “Yeast DNA Repair Protein RAD23 Promotes Complex Formation between Transcription Factor TFIIF and DNA Damage Recognition Factor RAD14.” *Journal of Biological Chemistry* 270 (15): 8385–88. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.15.8385>.
- Guzder, S. N., P. Sung, L. Prakash, and S. Prakash. 1998. “Affinity of Yeast Nucleotide Excision Repair Factor 2, Consisting of the Rad4 and Rad23 Proteins, for Ultraviolet Damaged DNA.” *Journal of Biological Chemistry* 273 (47): 31541–46. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.47.31541>.

- Hadi, Masood Z, Krzysztof Ginalski, Lam H Nguyen, and David M Wilson. 2002a. "Determinants in Nuclease Specificity of Ape1 and Ape2, Human Homologues of Escherichia Coli Exonuclease III." *Journal of Molecular Biology* 316 (3): 853–66. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5382>.
- . 2002b. "Determinants in Nuclease Specificity of Ape1 and Ape2, Human Homologues of Escherichia Coli Exonuclease III." *Journal of Molecular Biology* 316 (3): 853–66. <https://doi.org/10.1006/JMBI.2001.5382>.
- Hanawalt, Philip C. 2003. "Four Decades of DNA Repair: From Early Insights to Current Perspectives." *Biochimie* 85 (11): 1043–52. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2003.11.007>.
- Hanna, Michelle, Barbara L Chow, Natalie J Morey, Sue Jinks-Robertson, Paul W Doetsch, and Wei Xiao. 2004a. "Involvement of Two Endonuclease III Homologs in the Base Excision Repair Pathway for the Processing of DNA Alkylation Damage in *Saccharomyces Cerevisiae*." *DNA Repair* 3 (1): 51–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14697759>.
- . 2004b. "Involvement of Two Endonuclease III Homologs in the Base Excision Repair Pathway for the Processing of DNA Alkylation Damage in *Saccharomyces Cerevisiae*." *DNA Repair* 3 (1): 51–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14697759>.
- Hatakeyama, S., Y. Ito, A. Shimane, C. Ishii, and H. Inoue. 1998. "Cloning and Characterization of the Yeast RAD1 Homolog Gene (Mus-38) from *Neurospora Crassa*: Evidence for Involvement in Nucleotide Excision Repair." *Current Genetics* 33 (4): 276–83. <https://doi.org/10.1007/s002940050337>.
- Hazra, Tapas K, Aditi Das, Soumita Das, Sujata Choudhury, Yoke W Kow, and Rabindra Roy. 2007. "Oxidative DNA Damage Repair in Mammalian Cells: A New Perspective." *DNA Repair* 6 (4): 470–80. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.011>.
- Head, Nathan E, and Hongwei Yu. 2004. "Cross-Sectional Analysis of Clinical and Environmental Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa*: Biofilm Formation, Virulence, and Genome Diversity." *Infection and Immunity* 72 (1): 133–44. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.133-144.2004>.
- Hegde, Muralidhar L, Tapas K Hazra, and Sankar Mitra. 2008. "Early Steps in the DNA Base Excision/Single-Strand Interruption Repair Pathway in Mammalian Cells." *Cell Research* 18 (1): 27–47. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.8>.
- Hoff, Grégory, Claire Bertrand, Emilie Piotrowski, Annabelle Thibessard, and Pierre Leblond. 2018. "Genome Plasticity Is Governed by Double Strand Break DNA Repair in *Streptomyces*." *Scientific Reports* 8 (1): 5272. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23622-w>.
- Hoogstraten, Deborah, Steven Bergink, Jessica M Y Ng, Vincent H M Verbiest, Martijn S Luijsterburg, Bart Geverts, Anja Raams, et al. 2008. "Versatile DNA Damage Detection by the Global Genome Nucleotide Excision Repair Protein XPC." *Journal of Cell Science* 121 (Pt 17): 2850–59. <https://doi.org/10.1242/jcs.031708>.
- Hori, Akiko, Minoru Yoshida, Takehiko Shibata, and Feng Ling. 2009. "Reactive Oxygen Species Regulate DNA Copy Number in Isolated Yeast Mitochondria by

- Triggering Recombination-Mediated Replication.” *Nucleic Acids Research* 37 (3): 749–61. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn993>.
- Hossain, Md. Akram, Yunfeng Lin, and Shan Yan. 2018. “Single-Strand Break End Resection in Genome Integrity: Mechanism and Regulation by APE2.” *International Journal of Molecular Sciences* 19 (8). <https://doi.org/10.3390/IJMS19082389>.
- Izumi, T, T K Hazra, I Boldogh, a E Tomkinson, M S Park, S Ikeda, and S Mitra. 2000. “Requirement for Human AP Endonuclease 1 for Repair of 3’-Blocking Damage at DNA Single-Strand Breaks Induced by Reactive Oxygen Species.” *Carcinogenesis* 21 (7): 1329–34. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.5.329>.
- J, Zhang, Stevens MF, and Bradshaw TD. 2012. “Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance.” *Current Molecular Pharmacology* 5 (1). <https://doi.org/10.2174/1874467211205010102>.
- Janzer, Andreas, Soyoung Lim, Florian Fronhoffs, Naima Niazy, Reinhard Buettner, and Jutta Kirfel. 2012. “Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1) and Histone Deacetylase 1 (HDAC1) Synergistically Repress Proinflammatory Cytokines and Classical Complement Pathway Components.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 421 (4): 665–70. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.057>.
- Jedinak, Andrej, Shailesh Dudhgaonkar, Mark R Kelley, and Daniel Sliva. 2011. “Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 Regulates Inflammatory Response in Macrophages.” *Anticancer Research* 31 (2): 379–85. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3256557&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- JF, Ward. 1994. “The Complexity of DNA Damage: Relevance to Biological Consequences.” *International Journal of Radiation Biology* 66 (5). <https://doi.org/10.1080/09553009414551401>.
- Johnson, R E, C A Torres-Ramos, T Izumi, S Mitra, S Prakash, and L Prakash. 1998. “Identification of APN2, the *Saccharomyces Cerevisiae* Homolog of the Major Human AP Endonuclease HAP1, and Its Role in the Repair of Abasic Sites.” *Genes & Development* 12 (19): 3137–43. <https://doi.org/10.1101/gad.12.19.3137>.
- Johnson, Robert E, Carlos A Torres-Ramos, Tadahide Izumi, Sankar Mitra, Satya Prakash, and Louise Prakash. 1998. “Identification of APN2, the *Saccharomyces Cerevisiae* Homolog of the Major Human AP Endonuclease HAP1, and Its Role in the Repair of Abasic Sites.” www.genesdev.org.
- Jung, Kwang-Woo, Dong-Hoon Yang, Min-Kyu Kim, Ho Seong Seo, Sangyong Lim, and Yong-Sun Bahn. 2016a. “Unraveling Fungal Radiation Resistance Regulatory Networks through the Genome-Wide Transcriptome and Genetic Analyses of *Cryptococcus Neoformans*.” *MBio* 7 (6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01483-16>.
- . 2016b. “Unraveling Fungal Radiation Resistance Regulatory Networks through the Genome-Wide Transcriptome and Genetic Analyses of *Cryptococcus Neoformans*.” *MBio* 7 (6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01483-16>.
- Jung, Kwang-Woo, Dong-Hoon Yang, Shinae Maeng, Kyung-Tae Lee, Yee-Seul So, Joohyeon Hong, Jaeyoung Choi, et al. 2015a. “Systematic Functional Profiling of Transcription Factor Networks in *Cryptococcus Neoformans*.” *Nature Communications* 6: 6757. <https://doi.org/10.1038/ncomms7757>.

- . 2015b. “Systematic Functional Profiling of Transcription Factor Networks in *Cryptococcus Neoformans*.” *Nature Communications* 6 (April): 6757. <https://doi.org/10.1038/ncomms7757>.
- . 2015c. “Systematic Functional Profiling of Transcription Factor Networks in *Cryptococcus Neoformans*.” *Nature Communications* 6 (April): 6757. <https://doi.org/10.1038/ncomms7757>.
- Karkowska-Kuleta, Justyna, Maria Rapala-Kozik, and Andrzej Kozik. 2009. “Fungi Pathogenic to Humans: Molecular Bases of Virulence of *Candida Albicans*, *Cryptococcus Neoformans* and *Aspergillus Fumigatus*.” *Acta Biochimica Polonica* 56 (2): 211–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19543556>.
- Kelley, M.R., and M.L. Fishel. 2016a. “Overview of DNA Repair Pathways, Current Targets, and Clinical Trials Bench to Clinic.” In *DNA Repair in Cancer Therapy*, 1–54. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803582-5.00001-2>.
- . 2016b. “Overview of DNA Repair Pathways, Current Targets, and Clinical Trials Bench to Clinic.” *DNA Repair in Cancer Therapy*, January, 1–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803582-5.00001-2>.
- Kelley, Mark R., Yoke W. Kow, and David M. Wilson. 2003. “Disparity between DNA Base Excision Repair in Yeast and Mammals.” *Cancer Research* 63 (3): 549–54. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/63/3/549.full#ref-12>.
- Kiltie, Anne E. 2009. “Molecular Epidemiology of DNA Repair Genes in Bladder Cancer.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 472: 281–306. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-492-0_12.
- Kim, Jeong-Yoon. 2016. “Human Fungal Pathogens: Why Should We Learn?” *Journal of Microbiology* 54 (3): 145–48. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-0647-8>.
- Kim, Min Su, Seo-Young Kim, Ja Kyung Yoon, Yin-Won Lee, and Yong-Sun Bahn. 2009. “An Efficient Gene-Disruption Method in *Cryptococcus Neoformans* by Double-Joint PCR with NAT-Split Markers.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390 (3): 983–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.089>.
- Ko, Young-Joon, Yeong Man Yu, Gyu-Bum Kim, Gir-Won Lee, Pil Jae Maeng, Sangsoo Kim, Anna Floyd, Joseph Heitman, and Yong-Sun Bahn. 2009. “Remodeling of Global Transcription Patterns of *Cryptococcus Neoformans* Genes Mediated by the Stress-Activated HOG Signaling Pathways.” *Eukaryotic Cell* 8 (8): 1197–1217. <https://doi.org/10.1128/EC.00120-09>.
- Kondo, Natsuko, Akihisa Takahashi, Koji Ono, and Takeo Ohnishi. 2010. “DNA Damage Induced by Alkylating Agents and Repair Pathways.” *Journal of Nucleic Acids* 2010 (November): 543531. <https://doi.org/10.4061/2010/543531>.
- Kozubowski, Lukasz, and Joseph Heitman. 2012. “Profiling a Killer, the Development of *Cryptococcus Neoformans*.” *FEMS Microbiology Reviews* 36 (1): 78–94. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00286.x>.
- Krokan, Hans E., and Magnar Bjørås. 2013a. “Base Excision Repair.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (4). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A012583>.

- Krokan, Hans E, and Magnar Bjørås. 2013b. "Base Excision Repair." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (4): a012583. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583>.
- . 2013c. "Base Excision Repair." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (4): a012583. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583>.
- Kunz, Christophe, and Oliver Fleck. 2001. "Role of the DNA Repair Nucleases Rad13, Rad2 and Uve1 of *Schizosaccharomyces Pombe* in Mismatch Correction." *Journal of Molecular Biology* 313 (2): 241–53. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5054>.
- Kwon-Chung, K J, J C Edman, and B L Wickes. 1992. "Genetic Association of Mating Types and Virulence in *Cryptococcus Neoformans*." *Infection and Immunity* 60 (2): 602–5. <https://doi.org/10.1128/iai.60.2.602-605.1992>.
- Kwon-Chung, Kyung J., and Yun C. Chang. 2012. "Aneuploidy and Drug Resistance in Pathogenic Fungi." Edited by Joseph Heitman. *PLoS Pathogens* 8 (11): e1003022. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003022>.
- Kwon-Chung, Kyung J., James A. Fraser, Tamara L. Doering, Zhou Wang, Guilhem Janbon, Alexander Idnurm, and Yong-Sun Bahn. 2014. "Cryptococcus Neoformans and *Cryptococcus Gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4 (7). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A019760>.
- Lagerwerf, Saskia, Mischa G. Vrouwe, René M. Overmeer, Maria I. Fousteri, and Leon H.F. Mullenders. 2011. "DNA Damage Response and Transcription." *DNA Repair* 10 (7): 743–50. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.04.024>.
- Leach, Michelle D, David A Stead, Evelyn Argo, Donna M MacCallum, and Alistair J P Brown. 2011. "Molecular and Proteomic Analyses Highlight the Importance of Ubiquitination for the Stress Resistance, Metabolic Adaptation, Morphogenetic Regulation and Virulence of *Candida Albicans*." *Molecular Microbiology* 79 (6): 1574–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07542.x>.
- Legrand, M., C. L. Chan, P. A. Jauert, and D. T. Kirkpatrick. 2008. "Analysis of Base Excision and Nucleotide Excision Repair in *Candida Albicans*." *Microbiology* 154 (8): 2446–56. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/017616-0>.
- Legrand, Melanie, Christine L. Chan, Peter A. Jauert, and David T. Kirkpatrick. 2007. "Role of DNA Mismatch Repair and Double-Strand Break Repair in Genome Stability and Antifungal Drug Resistance in *Candida Albicans*." *Eukaryotic Cell* 6 (12): 2194–2205. <https://doi.org/10.1128/EC.00299-07>.
- Legrand, Melanie, Christine L Chan, Peter A Jauert, and David T Kirkpatrick. 2008. "Analysis of Base Excision and Nucleotide Excision Repair in *Candida Albicans*." *Microbiology (Reading, England)* 154 (Pt 8): 2446–56. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/017616-0>.
- Lenhart, J. S., J. W. Schroeder, B. W. Walsh, and L. A. Simmons. 2012. "DNA Repair and Genome Maintenance in *Bacillus Subtilis*." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76 (3): 530–64. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05020-11>.
- Levitz, Stuart M. 1991. "The Ecology of *Cryptococcus Neoformans* and the Epidemiology of Cryptococcosis." *Reviews of Infectious Diseases* 13 (6): 1163–69.

<https://doi.org/10.1093/clinids/13.6.1163>.

- Li, Mengxia, and David M Wilson. 2014a. "Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1." *Antioxidants & Redox Signaling* 20 (4): 678–707. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5492>.
- . 2014b. "Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1." *Antioxidants & Redox Signaling* 20 (4): 678–707. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5492>.
- Li, Yue, Jing Yan, Ikjin Kim, Chang Liu, Keke Huo, and Hai Rao. 2010. "Rad4 Regulates Protein Turnover at a Postubiquitylation Step." *Molecular Biology of the Cell* 21 (1): 177–85. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-04-0305>.
- Lindahl, T, and S Ljungquist. 1975. "Apurinic and Apyrimidinic Sites in DNA." *Basic Life Sciences* 5A (January): 31–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/242315>.
- Ling, Feng, Akiko Hori, Ayako Yoshitani, Rong Niu, Minoru Yoshida, and Takehiko Shibata. 2013. "Din7 and Mhr1 Expression Levels Regulate Double-Strand-Break-Induced Replication and Recombination of MtDNA at Ori5 in Yeast." *Nucleic Acids Research* 41 (11): 5799–5816. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt273>.
- Liu, Lili, and Stanton L Gerson. 2004. "Therapeutic Impact of Methoxyamine: Blocking Repair of Abasic Sites in the Base Excision Repair Pathway." *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000)* 5 (6): 623–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15242251>.
- Liu, Oliver W., Cheryl D. Chun, Eric D. Chow, Changbin Chen, Hiten D. Madhani, and Suzanne M. Noble. 2008. "Systematic Genetic Analysis of Virulence in the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus Neoformans*." *Cell* 135 (1): 174–88. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.046>.
- Liu, Yang, Dara Reeves, Konstantin Kropachev, Yuqin Cai, Shuang Ding, Marina Kolbanovskiy, Alexander Kolbanovskiy, et al. 2011. "Probing for DNA Damage with β -Hairpins: Similarities in Incision Efficiencies of Bulky DNA Adducts by Prokaryotic and Human Nucleotide Excision Repair Systems in Vitro." *DNA Repair* 10 (7): 684–96. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.04.020>.
- Loftus, Brendan J, Eula Fung, Paola Roncaglia, Don Rowley, Paolo Amedeo, Dan Bruno, Jessica Vamathevan, et al. 2005. "The Genome of the Basidiomycetous Yeast and Human Pathogen *Cryptococcus Neoformans*." *Science (New York, N.Y.)* 307 (5713): 1321–24. <https://doi.org/10.1126/science.1103773>.
- Lombard, David B, Katrin F Chua, Raul Mostoslavsky, Sonia Franco, Monica Gostissa, and Frederick W Alt. 2005. "DNA Repair, Genome Stability, and Aging." *Cell* 120 (4): 497–512. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.028>.
- Lorenz, Michael C, Jennifer A Bender, and Gerald R Fink. 2004. "Transcriptional Response of *Candida Albicans* upon Internalization by Macrophages." *Eukaryotic Cell* 3 (5): 1076–87. <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1076-1087.2004>.
- Lukas, Jiri, Claudia Lukas, and Jiri Bartek. 2004. "Mammalian Cell Cycle Checkpoints: Signalling Pathways and Their Organization in Space and Time." *DNA Repair* 3 (8–9): 997–1007. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.006>.
- . 2011. "More than Just a Focus: The Chromatin Response to DNA Damage and Its Role in Genome Integrity Maintenance." *Nature Cell Biology* 13 (10): 1161–69.

<https://doi.org/10.1038/ncb2344>.

- Luo, Meihua, Hongzhen He, Mark R Kelley, and Millie M Georgiadis. 2010. "Redox Regulation of DNA Repair: Implications for Human Health and Cancer Therapeutic Development." *Antioxidants & Redox Signaling* 12 (11): 1247–69. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2698>.
- Luo, Meihua, Jun Zhang, Hongzhen He, Dian Su, Qiujia Chen, Michael L Gross, Mark R Kelley, and Millie M Georgiadis. 2012. "Characterization of the Redox Activity and Disulfide Bond Formation in Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease." *Biochemistry* 51 (2): 695–705. <https://doi.org/10.1021/bi201034z>.
- Ma, Wenjian, James W Westmoreland, and Michael A Resnick. 2013. "Homologous Recombination Rescues SsDNA Gaps Generated by Nucleotide Excision Repair and Reduced Translesion DNA Synthesis in Yeast G2 Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (31): E2895-904. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301676110>.
- Madeo, F, E Fröhlich, M Ligr, M Grey, S J Sigrist, D H Wolf, and K U Fröhlich. 1999. "Oxygen Stress: A Regulator of Apoptosis in Yeast." *The Journal of Cell Biology* 145 (4): 757–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10330404>.
- Magditch, Denise A., Tong-Bao Liu, Chaoyang Xue, Alexander Idnurm, BJ Park, KA Wannemuehler, BJ Marston, et al. 2012. "DNA Mutations Mediate Microevolution between Host-Adapted Forms of the Pathogenic Fungus *Cryptococcus Neoformans*." Edited by Robin Charles May. *PLoS Pathogens* 8 (10): e1002936. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002936>.
- Magditch, Denise A, Tong-Bao Liu, Chaoyang Xue, and Alexander Idnurm. 2012. "DNA Mutations Mediate Microevolution between Host-Adapted Forms of the Pathogenic Fungus *Cryptococcus Neoformans*." *PLoS Pathogens* 8 (10): e1002936. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002936>.
- McCready, S, A M Carr, and A R Lehmann. 1993. "Repair of Cyclobutane Pyrimidine Dimers and 6-4 Photoproducts in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*." *Molecular Microbiology* 10 (4): 885–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7934850>.
- McDonald, Tami, Darin L. Wiesner, and Kirsten Nielsen. 2012. "Cryptococcus." *Current Biology: CB* 22 (14): R554. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2012.05.040>.
- McKinnon, Peter J. 2013. "Maintaining Genome Stability in the Nervous System." *Nature Neuroscience* 16 (11): 1523–29. <https://doi.org/10.1038/nn.3537>.
- MF, Price, Wilkinson ID, and Gentry LO. 1982. "Plate Method for Detection of Phospholipase Activity in *Candida Albicans*." *Sabouraudia* 20 (1). <https://doi.org/10.1080/00362178285380031>.
- Min, Jung-Hyun, and Nikola P. Pavletich. 2007. "Recognition of DNA Damage by the Rad4 Nucleotide Excision Repair Protein." *Nature* 449 (7162): 570–75. <https://doi.org/10.1038/nature06155>.
- Missall, Tricia Ann, Mary Ellen Pusateri, and Jennifer K Lodge. 2004. "Thiol Peroxidase Is Critical for Virulence and Resistance to Nitric Oxide and Peroxide in the Fungal Pathogen, *Cryptococcus Neoformans*." *Molecular Microbiology* 51 (5): 1447–58.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.03921.x>.

- Morrow, Carl A, and James A Fraser. 2013. "Ploidy Variation as an Adaptive Mechanism in Human Pathogenic Fungi." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24 (4): 339–46. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2013.01.008>.
- Moskwa, Patryk, Francesca M Buffa, Yunfeng Pan, Rohit Panchakshari, Ponnari Gottipati, Ruth J Muschel, John Beech, et al. 2011. "MiR-182-Mediated Downregulation of BRCA1 Impacts DNA Repair and Sensitivity to PARP Inhibitors." *Molecular Cell* 41 (2): 210–20. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.005>.
- Mourad, Ahmad, John R Perfect, Ahmad Mourad, and John R Perfect. 2018. "The War on Cryptococcosis: A Review of the Antifungal Arsenal." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 113 (7). <https://doi.org/10.1590/0074-02760170391>.
- Mylonakis, Eleftherios, Roberto Moreno, Joseph B El Khoury, Alexander Idnurm, Joseph Heitman, Stephen B Calderwood, Frederick M Ausubel, and Andrew Diener. 2005. "Galleria Mellonella as a Model System to Study Cryptococcus Neoformans Pathogenesis." *Infection and Immunity* 73 (7): 3842–50. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.3842-3850.2005>.
- Nakamura, Toru M, Li-Lin Du, Christophe Redon, and Paul Russell. 2004. "Histone H2A Phosphorylation Controls Crb2 Recruitment at DNA Breaks, Maintains Checkpoint Arrest, and Influences DNA Repair in Fission Yeast." *Molecular and Cellular Biology* 24 (14): 6215–30. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.14.6215-6230.2004>.
- Nicola, André Moraes, Emma J Robertson, Patrícia Albuquerque, Lorena da Silveira Derengowski, and Arturo Casadevall. 2011. "Nonlytic Exocytosis of Cryptococcus Neoformans from Macrophages Occurs in Vivo and Is Influenced by Phagosomal PH." *MBio* 2 (4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00167-11>.
- Niimi, Masakazu. 2010. "Characterization of the Multi-Drug Efflux Systems of Pathogenic Fungi Using Functional Hyperexpression in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi = Japanese Journal of Medical Mycology* 51 (2): 79–86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20467195>.
- Nosanchuk, Joshua D., Ruth E. Stark, and Arturo Casadevall. 2015. "Fungal Melanin: What Do We Know About Structure?" *Frontiers in Microbiology* 6 (December): 1463. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01463>.
- Okazaki, T, U Chung, T Nishishita, S Ebisu, S Usuda, S Mishiro, S Xanthoudakis, T Igarashi, and E Ogata. 1994. "A Redox Factor Protein, Ref1, Is Involved in Negative Gene Regulation by Extracellular Calcium." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (45): 27855–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7961715>.
- Oliver, A, R Cantón, P Campo, F Baquero, and J Blázquez. 2000. "High Frequency of Hypermutable *Pseudomonas Aeruginosa* in Cystic Fibrosis Lung Infection." *Science (New York, N.Y.)* 288 (5469): 1251–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10818002>.
- Osman, Fekret, Magnar Bjørås, Ingrun Alseth, Ingrid Morland, S McCready, Erling Seeberg, and Irina Tsaneva. 2003. "A New *Schizosaccharomyces Pombe* Base Excision Repair Mutant, Nth1, Reveals Overlapping Pathways for Repair of DNA Base Damage." *Molecular Microbiology* 48 (2): 465–80.

<https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2003.03440.X>.

- Overmeer, R. M., A. M. Gourdin, A. Giglia-Mari, H. Kool, A. B. Houtsmuller, G. Siegal, M. I. Foustieri, L. H. F. Mullenders, and W. Vermeulen. 2010. "Replication Factor C Recruits DNA Polymerase to Sites of Nucleotide Excision Repair but Is Not Required for PCNA Recruitment." *Molecular and Cellular Biology* 30 (20): 4828–39. <https://doi.org/10.1128/MCB.00285-10>.
- Palmer, Jonathan M, Kevin P Drees, Jeffrey T Foster, and Daniel L Lindner. n.d. "Extreme Sensitivity to Ultraviolet Light in the Fungal Pathogen Causing White-Nose Syndrome of Bats." Accessed April 19, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02441-z>.
- Paul, Sanjoy, Tamara L. Doering, and W. Scott Moye-Rowley. 2015a. "Cryptococcus Neoformans Yap1 Is Required for Normal Fluconazole and Oxidative Stress Resistance." *Fungal Genetics and Biology* 74 (January): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.015>.
- . 2015b. "Cryptococcus Neoformans Yap1 Is Required for Normal Fluconazole and Oxidative Stress Resistance." *Fungal Genetics and Biology* 74 (January): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.015>.
- Pejanovic, Nadja, Karin Hochrainer, Tao Liu, Birgit L Aerne, Miguel P Soares, and Josef Anrather. 2012. "Regulation of Nuclear Factor KB (NF-KB) Transcriptional Activity via P65 Acetylation by the Chaperonin Containing TCP1 (CCT)." *PloS One* 7 (7): e42020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042020>.
- Pfaller, M A, P R Rhomberg, S A Messer, and M Castanheira. 2015. "In Vitro Activity of a Hos2 Deacetylase Inhibitor, MGCD290, in Combination with Echinocandins against Echinocandin-Resistant Candida Species." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 81 (4): 259–63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.11.008>.
- Pichiorri, Flavia, Hideshi Ishii, Hiroshi Okumura, Francesco Trapasso, Ya Wang, and Kay Huebner. 2008. "Molecular Parameters of Genome Instability: Roles of Fragile Genes at Common Fragile Sites." *Journal of Cellular Biochemistry* 104 (5): 1525–33. <https://doi.org/10.1002/jcb.21560>.
- Pines, Alex, Lorena Perrone, Nicoletta Bivi, Milena Romanello, Giuseppe Damante, Massimo Gulisano, Mark R Kelley, Franco Quadrifoglio, and Gianluca Tell. 2005. "Activation of APE1/Ref-1 Is Dependent on Reactive Oxygen Species Generated after Purinergic Receptor Stimulation by ATP." *Nucleic Acids Research* 33 (14): 4379–94. <https://doi.org/10.1093/nar/gki751>.
- Piscitelli, Alessandra, Paola Giardina, Vincenzo Lettera, Cinzia Pezzella, Giovanni Sanna, and Vincenza Faraco. 2011. "Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi." *Current Genomics* 12 (2): 104–12. <https://doi.org/10.2174/138920211795564331>.
- Popoff, S C, A I Spira, A W Johnson, and B Demple. 1990. "Yeast Structural Gene (APN1) for the Major Apurinic Endonuclease: Homology to Escherichia Coli Endonuclease IV." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (11): 4193–97. <https://doi.org/10.1073/PNAS.87.11.4193>.
- PR, Williamson. 1997. "Laccase and Melanin in the Pathogenesis of Cryptococcus

- Neoformans.” *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 2. <https://doi.org/10.2741/A231>.
- Prakash, S, and L Prakash. 2000. “Nucleotide Excision Repair in Yeast.” *Mutation Research* 451 (1–2): 13–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10915862>.
- PW, Doetsch, Morey NJ, Swanson RL, and Jinks-Robertson S. 2001. “Yeast Base Excision Repair: Interconnections and Networks.” *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 68. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(01\)68087-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(01)68087-5).
- R, Ikeda, Sugita T, Jacobson ES, and Shinoda T. 2003. “Effects of Melanin Upon Susceptibility of *Cryptococcus* to Antifungals.” *Microbiology and Immunology* 47 (4). <https://doi.org/10.1111/J.1348-0421.2003.TB03395.X>.
- Rajasingham, Radha, Rachel M Smith, Benjamin J Park, Joseph N Jarvis, Nelesh P Govender, Tom M Chiller, David W Denning, Angela Loyse, and David R Boulware. 2017. “Global Burden of Disease of HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: An Updated Analysis.” *The Lancet. Infectious Diseases* 17 (8): 873–81. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8).
- Ramotar, D, C Kim, R Lillis, and B Demple. 1993. “Intracellular Localization of the Apn1 DNA Repair Enzyme of *Saccharomyces Cerevisiae*. Nuclear Transport Signals and Biological Role.” *The Journal of Biological Chemistry* 268 (27): 20533–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7690756>.
- Ramotar, Dindial, Julie Vadnais, Jean-Yves Masson, and Stephane Tremblay. 1998. “Schizosaccharomyces Pombe Apn1 Encodes a Homologue of the Escherichia Coli Endonuclease IV Family of DNA Repair Proteins.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1396 (1): 15–20. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(97\)00160-7](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(97)00160-7).
- Rastogi, Rajesh P, Richa, Ashok Kumar, Madhu B Tyagi, and Rajeshwar P Sinha. 2010. “Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair.” *Journal of Nucleic Acids* 2010 (December): 592980. <https://doi.org/10.4061/2010/592980>.
- RB, Billmyre, Clancey SA, and Heitman J. 2017. “Natural Mismatch Repair Mutations Mediate Phenotypic Diversity and Drug Resistance in *Cryptococcus Deuterogattii*.” *ELife* 6. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.28802>.
- RD, Wood. 1996. “DNA Repair in Eukaryotes.” *Annual Review of Biochemistry* 65. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BI.65.070196.001031>.
- Reed, Simon H, and Thomas G Gillette. 2007. “Nucleotide Excision Repair and the Ubiquitin Proteasome Pathway--Do All Roads Lead to Rome?” *DNA Repair* 6 (2): 149–56. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.026>.
- Ribar, Balazs, Tadahide Izumi, and Sankar Mitra. 2004. “The Major Role of Human AP-Endonuclease Homolog Apn2 in Repair of Abasic Sites in *Schizosaccharomyces Pombe*.” *Nucleic Acids Research* 32 (1): 115. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKH151>.
- Rodrigues-Pousada, Claudina, Regina A Menezes, and Catarina Pimentel. 2010. “The Yap Family and Its Role in Stress Response.” *Yeast (Chichester, England)* 27 (5):

245–58. <https://doi.org/10.1002/yea.1752>.

- Rosa, S, P Fortini, P Karran, M Bignami, and E Dogliotti. 1991. “Processing in Vitro of an Abasic Site Reacted with Methoxyamine: A New Assay for the Detection of Abasic Sites Formed in Vivo.” *Nucleic Acids Research* 19 (20): 5569–74. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=328958&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Rosenberg, Susan M. 1997. “Mutation for Survival.” *Current Opinion in Genetics & Development* 7 (6): 829–34. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(97\)80047-0](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(97)80047-0).
- S, Sengupta, Mantha AK, Mitra S, and Bhakat KK. 2011. “Human AP Endonuclease (APE1/Ref-1) and Its Acetylation Regulate YB-1-P300 Recruitment and RNA Polymerase II Loading in the Drug-Induced Activation of Multidrug Resistance Gene MDR1.” *Oncogene* 30 (4). <https://doi.org/10.1038/ONC.2010.435>.
- Sabiiti, Wilber, and Robin C May. 2012. “Mechanisms of Infection by the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus Neoformans*.” *Future Microbiology* 7 (11): 1297–1313. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.102>.
- Sabiiti, Wilber, Emma Robertson, Mathew A Beale, Simon A Johnston, Annemarie E Brouwer, Angela Loyse, Joseph N Jarvis, et al. 2014. “Efficient Phagocytosis and Laccase Activity Affect the Outcome of HIV-Associated Cryptococcosis.” *The Journal of Clinical Investigation* 124 (5): 2000–2008. <https://doi.org/10.1172/JCI72950>.
- Salmon, Tiffany B, Barbara A Evert, Binwei Song, and Paul W Doetsch. 2004. “Biological Consequences of Oxidative Stress-Induced DNA Damage in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Nucleic Acids Research* 32 (12): 3712–23. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh696>.
- Santiago-Tirado, Felipe H, Tao Peng, Meng Yang, Howard C Hang, and Tamara L Doering. 2015. “A Single Protein S-Acyl Transferase Acts through Diverse Substrates to Determine Cryptococcal Morphology, Stress Tolerance, and Pathogenic Outcome.” *PLOS Pathogens* 11 (5): e1004908. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004908>.
- Schärer, O D, and Orlando D Schärer. 2009. “SWISS CHEMISTS IN THE USA Structure-Specific Endonucleases in DNA Repair.” *Chimia* 63: 753–57. <https://doi.org/10.2533/chimia.2009.753>.
- Schärer, Orlando D. 2013. “Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (10). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A012609>.
- Schrader, Carol E, Jeroen E.J Guikema, Xiaoming Wu, and Janet Stavnezer. 2009. “The Roles of APE1, APE2, DNA Polymerase β and Mismatch Repair in Creating S Region DNA Breaks during Antibody Class Switch.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364 (1517): 645–52. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0200>.
- Schwarz, Patrick, Guilhem Janbon, Françoise Dromer, Olivier Lortholary, and Eric Dannaoui. 2007. “Combination of Amphotericin B with Flucytosine Is Active In Vitro against Flucytosine-Resistant Isolates of *Cryptococcus Neoformans*.” *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 51 (1): 383–85.

<https://doi.org/10.1128/AAC.00446-06>.

- Sengupta, S, A K Mantha, S Mitra, and K K Bhakat. 2011. "Human AP Endonuclease (APE1/Ref-1) and Its Acetylation Regulate YB-1-P300 Recruitment and RNA Polymerase II Loading in the Drug-Induced Activation of Multidrug Resistance Gene MDR1." *Oncogene* 30 (4): 482–93. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.435>.
- SenGupta, Tanima, Maria Lyngaas Torgersen, Henok Kassahun, Tibor Vellai, Anne Simonsen, and Hilde Nilsen. 2013. "Base Excision Repair AP Endonucleases and Mismatch Repair Act Together to Induce Checkpoint-Mediated Autophagy." *Nature Communications* 4 (May): 2674. <https://doi.org/10.1038/ncomms3674>.
- Shiloh, Yosef, and Alan R Lehmann. 2004. "Maintaining Integrity." *Nature Cell Biology* 6 (10): 923–28. <https://doi.org/10.1038/ncb1004-923>.
- Shinagawa, H. 1996. "SOS Response as an Adaptive Response to DNA Damage in Prokaryotes." *EXS* 77: 221–35.
- Sipiczki, M. 2000. "Where Does Fission Yeast Sit on the Tree of Life?" *Genome Biology* 1 (2): 1–4. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-2-reviews1011>.
- Skoneczna, Adrianna, Aneta Kaniak, and Marek Skoneczny. 2015. "Genetic Instability in Budding and Fission Yeast-Sources and Mechanisms." *FEMS Microbiology Reviews* 39 (6): 917–67. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv028>.
- Spivak, Graciela. 2016. "Transcription-Coupled Repair: An Update." *Archives of Toxicology* 90 (11): 2583–94. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1820-x>.
- Srikanta, Deepa, Felipe H Santiago-Tirado, and Tamara L Doering. 2014. "Cryptococcus Neoformans: Historical Curiosity to Modern Pathogen." *Yeast (Chichester, England)* 31 (2): 47–60. <https://doi.org/10.1002/yea.2997>.
- Staresincic, Lidija, Adebanye F Fagbemi, Jacqueline H Enzlin, Audrey M Gourdin, Nils Wijgers, Isabelle Dunand-Sauthier, Giuseppina Giglia-Mari, Stuart G Clarkson, Wim Vermeulen, and Orlando D Schärer. 2009. "Coordination of Dual Incision and Repair Synthesis in Human Nucleotide Excision Repair." *The EMBO Journal* 28 (8): 1111–20. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.49>.
- Sugasawa, K, T Okamoto, Y Shimizu, C Masutani, S Iwai, and F Hanaoka. 2001. "A Multistep Damage Recognition Mechanism for Global Genomic Nucleotide Excision Repair." *Genes & Development* 15 (5): 507–21. <https://doi.org/10.1101/gad.866301>.
- Sullivan, D, K Haynes, G Moran, D Shanley, and D Coleman. 1996. "Persistence, Replacement, and Microevolution of Cryptococcus Neoformans Strains in Recurrent Meningitis in AIDS Patients." *Journal of Clinical Microbiology* 34 (7): 1739–44. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=229105&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Swanson, R L, N J Morey, P W Doetsch, and S Jinks-Robertson. 1999. "Overlapping Specificities of Base Excision Repair, Nucleotide Excision Repair, Recombination, and Translesion Synthesis Pathways for DNA Base Damage in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* 19 (4): 2929–35. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.4.2929>.
- T, Lindahl, and Barnes DE. 2000. "Repair of Endogenous DNA Damage." *Cold Spring*

- T, Senoo, Kawano S, and Ikeda S. 2017. "DNA Base Excision Repair and Nucleotide Excision Repair Synergistically Contribute to Survival of Stationary-Phase Cells of the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*." *Cell Biology International* 41 (3). <https://doi.org/10.1002/CBIN.10722>.
- Takao, M, R Yonemasu, K Yamamoto, and A Yasui. 1996. "Characterization of a UV Endonuclease Gene from the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe* and Its Bacterial Homolog." *Nucleic Acids Research* 24 (7): 1267–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8614629>.
- Talia, Stefano Di, Hongyin Wang, Jan M Skotheim, Adam P Rosebrock, Bruce Futcher, and Frederick R Cross. 2009. "Daughter-Specific Transcription Factors Regulate Cell Size Control in Budding Yeast." *PLOS Biology* 7 (10): e1000221. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000221>.
- Tan, Glorijoy Shi En, and Li Yang B T - Reference Module in Biomedical Sciences Hsu. 2018. "Overview of Fungal Infections☆." In . Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.98320-X>.
- Tell, Gianluca, Giuseppe Damante, David Caldwell, and Mark R Kelley. "The Intracellular Localization of APE1/Ref-1: More than a Passive Phenomenon?" *Antioxidants & Redox Signaling* 7 (3–4): 367–84. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.367>.
- Tell, Gianluca, Franco Quadrifoglio, Claudio Tiribelli, and Mark R Kelley. 2009. "The Many Functions of APE1/Ref-1: Not Only a DNA Repair Enzyme." *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (3): 601–20. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2194>.
- Thompson, Larry H, Kerry W Brookman, Larry E Dillehay, Carolyn L Mooney, and Anthony V Carrano. 1982. "Hypersensitivity to Mutation and Sister-Chromatid-Exchange Induction in CHO Cell Mutants Defective in Incising DNA Containing UV Lesions." *Somatic Cell Genetics* 8 (6): 759–73. <https://doi.org/10.1007/BF01543017>.
- Tishkoff, D X, A L Boerger, P Bertrand, N Filosi, G M Gaida, M F Kane, and R D Kolodner. 1997. "Identification and Characterization of *Saccharomyces Cerevisiae* EXO1, a Gene Encoding an Exonuclease That Interacts with MSH2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (14): 7487–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9207118>.
- Torres-Ramos, C A, R E Johnson, L Prakash, and S Prakash. 2000. "Evidence for the Involvement of Nucleotide Excision Repair in the Removal of Abasic Sites in Yeast." *Molecular and Cellular Biology* 20 (10): 3522–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10779341>.
- Unk, I, L Haracska, R E Johnson, S Prakash, and L Prakash. 2000. "Apurinic Endonuclease Activity of Yeast Apn2 Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (29): 22427–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002845200>.
- Unk, Ildiko, Lajos Haracska, Robert E. Johnson, Satya Prakash, and Louise Prakash. 2000. "Apurinic Endonuclease Activity of Yeast Apn2 Protein." *Journal of Biological Chemistry* 275 (29): 22427–34.

<https://doi.org/10.1074/JBC.M002845200>.

- Upadhyaya, Rajendra, Leona T. Campbell, Maureen J. Donlin, Rajeev Aurora, and Jennifer K. Lodge. 2013a. "Global Transcriptome Profile of *Cryptococcus Neoformans* during Exposure to Hydrogen Peroxide Induced Oxidative Stress." Edited by Maurizio Del Poeta. *PLoS ONE* 8 (1): e55110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055110>.
- Upadhyaya, Rajendra, Leona T Campbell, Maureen J Donlin, Rajeev Aurora, and Jennifer K Lodge. 2013b. "Global Transcriptome Profile of *Cryptococcus Neoformans* during Exposure to Hydrogen Peroxide Induced Oxidative Stress." *PloS One* 8 (1): e55110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055110>.
- Vascotto, Carlo, Laura Cesaratto, Leo a H Zeef, Marta Deganuto, Chiara D'Ambrosio, Andrea Scaloni, Milena Romanello, et al. 2009. "Genome-Wide Analysis and Proteomic Studies Reveal APE1/Ref-1 Multifunctional Role in Mammalian Cells." *Proteomics* 9 (4): 1058–74. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800638>.
- Velmurugu, Yogambigai, Xuejing Chen, Phillip Slogoff Sevilla, Jung-Hyun Min, and Anjum Ansari. 2016. "Twist-Open Mechanism of DNA Damage Recognition by the Rad4/XPC Nucleotide Excision Repair Complex." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (16): E2296–2305. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514666113>.
- Verma, Surbhi, Viplendra P S Shakya, and Alexander Idnurm. 2019. "The Dual Function Gene RAD23 Contributes to *Cryptococcus Neoformans* Virulence Independently of Its Role in Nucleotide Excision DNA Repair." *Gene* 717 (October): 144043. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144043>.
- Vermeulen, Wim, and Maria Foustieri. 2013. "Mammalian Transcription-Coupled Excision Repair." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (8): a012625. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012625>.
- Walker, D H, and M R McGinnis. 2014. "Diseases Caused by Fungi." In , edited by Linda M McManus and Richard N B T - Pathobiology of Human Disease Mitchell, 217–21. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.01710-X>.
- Wallace, Susan S. 2014. "Base Excision Repair: A Critical Player in Many Games." *DNA Repair* 19 (July): 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.030>.
- Wang, Lei, and Chih Cheng Tsai. 2008. "Atrophin Proteins: An Overview of a New Class of Nuclear Receptor Corepressors." *Nuclear Receptor Signaling* 6. <https://doi.org/10.1621/nrs.06009>.
- Wang, Y, and A Casadevall. 1994. "Decreased Susceptibility of Melanized *Cryptococcus Neoformans* to UV Light." *Applied and Environmental Microbiology* 60 (10): 3864–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7986054>.
- Weiss, G J, M S Gordon, L S Rosen, P Savvides, B J Adams, D Alvarez, L Liu, Y Xu, S L Gerson, and B R Leigh. 2010. "Final Results from a Phase I Study of Oral TRC102 (Methoxyamine HCl), an Inhibitor of Base-Excision Repair, to Potentiate the Activity of Pemetrexed in Patients with Refractory Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 28 (15_suppl): 2576. https://doi.org/10.1200/jco.2010.28.15_suppl.2576.

- Wilson, D M, and D Barsky. 2001. "The Major Human Abasic Endonuclease: Formation, Consequences and Repair of Abasic Lesions in DNA." *Mutation Research* 485 (4): 283–307. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585362>.
- Workman, C. T., H Craig Mak, Scott McCuine, Jean-Bosco Tagne, Maya Agarwal, Owen Ozier, Thomas J Begley, Leona D Samson, and Trey Ideker. 2006. "A Systems Approach to Mapping DNA Damage Response Pathways." *Science* 312 (5776): 1054–59. <https://doi.org/10.1126/science.1122088>.
- Xiao, W, and B L Chow. 1998. "Synergism between Yeast Nucleotide and Base Excision Repair Pathways in the Protection against DNA Methylation Damage." *Current Genetics* 33 (2): 92–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9506896>.
- Xiao, W, B L Chow, M Hanna, and P W Doetsch. 2001. "Deletion of the MAG1 DNA Glycosylase Gene Suppresses Alkylation-Induced Killing and Mutagenesis in Yeast Cells Lacking AP Endonucleases." *Mutation Research* 487 (3–4): 137–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11738940>.
- Xue, Chaoyang. 2012. "Cryptococcus and Beyond—Inositol Utilization and Its Implications for the Emergence of Fungal Virulence." *PLOS Pathogens* 8 (9): e1002869. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002869>.
- Y, Sedletska, Giraud-Panis MJ, and Malinge JM. 2005. "Cisplatin Is a DNA-Damaging Antitumour Compound Triggering Multifactorial Biochemical Responses in Cancer Cells: Importance of Apoptotic Pathways." *Current Medicinal Chemistry. Anti-Cancer Agents* 5 (3). <https://doi.org/10.2174/1568011053765967>.
- Yajima, H., M. Takao, S. Yasuhira, J.H. Zhao, C. Ishii, H. Inoue, and A. Yasui. 1995. "A Eukaryotic Gene Encoding an Endonuclease That Specifically Repairs DNA Damaged by Ultraviolet Light." *The EMBO Journal* 14 (10): 2393–99. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07234.x>.
- Yan, Tao, Yuji Seo, Jane E Schupp, and Xuehuo Zeng. 2006. "Methoxyamine Potentiates Iododeoxyuridine-Induced Radiosensitization by Altering Cell Cycle Kinetics and Enhancing Senescence Radiosensitization by Altering Cell Cycle Kinetics and Enhancing Senescence," 893–902. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0364>.
- Yang, Dong-Hoon, Kwang-Woo Jung, Soohyun Bang, Jang-Won Lee, Min-Hee Song, Anna Floyd-Averette, Richard A Festa, et al. 2017. "Rewiring of Signaling Networks Modulating Thermotolerance in the Human Pathogen *Cryptococcus Neoformans*." *Genetics* 205 (1): 201–19. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.190595>.
- Yang, Wei. 2011. "Surviving the Sun: Repair and Bypass of DNA UV Lesions." *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 20 (11): 1781–89. <https://doi.org/10.1002/pro.723>.
- Yasui, Akira. 2013. "Alternative Excision Repair Pathways." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (6): 1–8. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012617>.
- Yonemasu, R, S J McCreedy, J M Murray, F Osman, M Takao, K Yamamoto, A R Lehmann, and A Yasui. 1997. "Characterization of the Alternative Excision Repair Pathway of UV-Damaged DNA in *Schizosaccharomyces Pombe*." *Nucleic Acids Research* 25 (8): 1553–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9092661>.

- Zaragoza, Oscar, and Arturo Casadevall. 2004. "Experimental Modulation of Capsule Size in *Cryptococcus Neoformans*." *Biological Procedures Online* 6 (January): 10–15. <https://doi.org/10.1251/bpo68>.
- Zaragoza, Oscar, Marcio L Rodrigues, Magdia De Jesus, Susana Frases, Ekaterina Dadachova, and Arturo Casadevall. 2009. "The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus Neoformans*." *Advances in Applied Microbiology* 68 (January): 133–216. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)01204-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)01204-0).
- Zhou, Xin, Hanna Zafar, Poppy Sephton-Clark, Sally H Mohamed, Ambre Chapuis, Maria Makarova, Donna M MacCallum, Rebecca A Drummond, Ivy M Dambuza, and Elizabeth R Ballou. 2020. "Host Environmental Conditions Induce Small Fungal Cell Size and Alter Population Heterogeneity in *Cryptococcus Neoformans*." *BioRxiv*, January, 2020.01.03.894709. <https://doi.org/10.1101/2020.01.03.894709>.
- ZHU, X, and P WILLIAMSON. 2004. "Role of Laccase in the Biology and Virulence Of." *FEMS Yeast Research* 5 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.04.004>.

11. Apêndices

Tabela A1. Linhagens de *C. neoformans* usadas neste estudo.

| Linhagens | Gene | Genótipo | Fonte |
|-----------|------------------------------------|--|-----------------|
| H99 | - | MAT α | Duke University |
| RT5 | <i>APN1</i> | <i>apn1</i> Δ :: NAT MAT α | Este estudo |
| RT2 | <i>APN2</i> | <i>apn2</i> Δ :: HYG MAT α | Este estudo |
| RT3 | <i>APN1/APN2</i> | <i>apn1</i> Δ :: NAT + <i>apn2</i> Δ :: HYG MAT α | Este estudo |
| RT14 | <i>apn1</i> Δ + <i>APN1</i> | <i>apn1</i> Δ :: NAT + <i>APN1</i> + pZp (HYG) MAT α | Este estudo |
| RT13 | <i>apn2</i> Δ + <i>APN2</i> | <i>apn2</i> Δ :: NAT + <i>APN2</i> + pZp (NAT) MAT α | Este estudo |
| RT30 | <i>XPC</i> | <i>xpc</i> Δ :: HYG MAT α | Este estudo |

Tabela A2. Oligonucleotídeos usados neste estudo.

| Código | Identificação | Sequência (5'-3') |
|--------------------|---------------|---|
| <i>APN1</i> | | |
| P1(<i>APN1</i>) | 5'ext_APN1F | CGAGGAGCATAAGGAAGGAGA |
| P10(<i>APN1</i>) | 3'ext_APN1R | GCATGACAACCTTTCCCCTAGC |
| P3 (<i>APN1</i>) | 5'APN1F | GAGTTAAGGGGTGGGAGGAAT |
| P4 (<i>APN1</i>) | 3'APN1R | TCGCTGGAGTCTGTAGCTTGA |
| P5 (<i>APN1</i>) | nat_F | AGCAAGACCCATCAAAGCTCTA |
| P6 (<i>APN1</i>) | nat_R | CTCCAGAACATTCGTCGCTTAC |
| P11(<i>APN1</i>) | M13_5'APN1R | ATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTCTGGGCCTTTCACTCAAG AC |
| P12(<i>APN1</i>) | M13F_3'APN1F | GCACTGGCCGTCGTTTTACCAGACACGGCAGCTATCATTC |
| <i>APN2</i> | | |
| P1(<i>APN2</i>) | 5'ext_APN2F | CAAGCACCTTCTTACCCTCCT |
| P10(<i>APN2</i>) | 3'ext_APN2R | CCACTTACCAAAGCTCACTGG |
| P3 (<i>APN2</i>) | 5'APN2_F | GAATCGGACGATGATGCTGT |
| P4 (<i>APN2</i>) | 3'APN2R | CAAACCCCATTCCTACTGAC |
| P5 (<i>APN2</i>) | hyg_F | GCGGGAGATGCAATAGGTCAG |

| | | |
|-----------|--------------|---|
| P6 (APN2) | hyg_R | AGCTCTCGGAGGGCGAAGAAT |
| P11(APN2) | M13_5'APN2R | ATCATGTCATAGCTGTTTCCTGCTGTGTAGTGTCCCGATCC AT |
| P12(APN2) | M13F_3'APN2F | GCACTGGCCGTCGTTTTACCCCTTCTGGTTTAGCTGACG |

XPC

| | | |
|-----------|-------------|---|
| P1(XPC) | 5'ext_XPCF | GTTATGGTGGGGTGAAGGATG |
| P10(XPC) | 3'ext_XPCR | GCCTGATCCCAGCTTGAGTAG |
| P3 (XPC) | 5'XPC_F | TTGAACTGCGTGAGTGATGG |
| P4 (XPC) | 3'XPCR | CGATGACGAGGCATAGCTACA |
| P5 (XPC) | hyg_F | GCGGGAGATGCAATAGGTCAG |
| P6 (XPC) | hyg_R | AGCTCTCGGAGGGCGAAGAAT |
| P11 (XPC) | M13_5'XPCR | ATCATGTCATAGCTGTTTCCTGATGTGCTGTACTGGGGAAG GT |
| P12 (XPC) | M13F_3'XPCF | GCACTGGCCGTCGTTTTACGGCTATTAGTTCGGCAGATCC |