Construção e caracterização fenotípica de linhagem mutante para o gene putativo *ATL1* de *Cryptococcus neoformans*

Fernanda Fonsêca Ferreira

Brasília-DF

2018

FERNANDA FONSÊCA FERREIRA

Construção e caracterização fenotípica de linhagem mutante para o gene putativo *ATL1* de *Cryptococcus neoformans*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca.

Brasília-DF

2018

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Regulação Gênica e Mutagênese, Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

Esse trabalho teve apoio financeiro da Fundação Universidade de Brasília, Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal e da Secretaria de Estado de Educação do Distrito Federal.

"Era tão indescritivelmente belo, tão simples e excelente. Eu não podia entender como deixara de perceber aquilo e fiquei olhando, descrente, por vinte minutos. Então, durante o dia, eu caminhei pelo departamento e ficava voltando para minha mesa para ver se a solução ainda estava lá. Não podia me conter, estava tão empolgado. Era o momento mais importante de minha vida profissional. Nada nunca mais significaria tanto. (...) Assim, na primeira noite eu voltei para casa e dormi. Verifiquei tudo de novo na manhã seguinte e por volta das 11 horas fiquei satisfeito, desci e contei para minha mulher. 'Consegui! Acho que encontrei!' E foi tão inesperado que ela pensou que eu estava falando sobre um brinquedo das crianças ou alguma coisa, e ela disse: 'Descobriu o quê?' E eu disse: 'Eu consertei minha demonstração.'"

Andrew Wiles

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha família tão querida e amada. Aos meus pais, Marly e José Ademi, agradeço por terem me educado com tanta retidão, terem lutado tanto para formar a mim e meus irmãos como pessoas de bem, e por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todos os meus sonhos. Vocês dois são os meus maiores exemplos de que, com trabalho duro e força de vontade, nenhum sonho é impossível. Aos meus irmãos, Flávio e Filipe, minha gratidão por todo apoio e ajuda em tudo que preciso. Quero sempre enchê-los de orgulho. Saibam que toda e qualquer conquista minha é, na verdade, de todos nós. Amo vocês quatro, do fundo do meu coração.

Ao meu companheiro de todas as horas, João Neto: não há linhas que caibam toda a minha gratidão para contigo. Obrigada por todo o companheirismo, apoio, palavras de força, consolo e ajuda durante essa etapa de minha vida. Obrigada também pela essencial contribuição no desenvolvimento das figuras deste trabalho. Sem você, tudo seria mais difícil e sonhar não seria tão belo. Amo-te! E que tenhamos ainda muitos outros desafios para vencermos juntos.

Ao meu orientador, o professor Dr. Marcio Poças, obrigada por ter me acolhido no laboratório desde os tempos da graduação, pela confiança e pela oportunidade de ter desenvolvido esse projeto de pesquisa tão bonito. Admiro a seriedade que você faz ciência e, sem dúvidas, muito aprendi contigo nessa jornada.

Meu agradecimento à professora Dr. Larissa Fernandes que, mesmo não formalmente, foi minha segunda orientadora no desenvolvimento deste mestrado. Sem você, este trabalho não seria possível. Obrigada por toda a orientação, pelos conselhos e por me socorrer sempre que precisei. Minha eterna gratidão!

Agradeço também à MSc. Rayssa Oliveira, parceira indispensável na realização deste trabalho. Obrigada por compartilhar seu conhecimento, sua empolgação em fazer ciência e suas ideias. Sou muito grata a você por todos os nossos momentos de partilha, de discussão de protocolos e resultados, e por toda sua ajuda sem medida.

Aos amigos do laboratório de Regulação Gênica e Mutagênese, MSc. Bruce, Camila Gomes, MSc. Kunal, Natasha, Edgar, MSc. João Heitor, Juliana, Camilinha e Sara: obrigada pela convivência diária tão agradável e companheirismo. Aos colegas do laboratório Maristela de Oliveira Azevedo – professora Dr. Ildinete Silva, professora Dr. Patrícia Albuquerque, professor Dr. Hugo, MSc. Rayssa, MSc. Fernanda, MSc. Jhones, MSc. Fabián, MSc. Stefania, André, Dr. Calliandra, MSc. Marcos – e do Laboratório de Imunologia Aplicada – professora

Dr. Larissa, Dr. Fabiana, MSc. Camille, Tulio, Narla – minha enorme gratidão pela disponibilidade sem igual de cada um e por sempre deixarem o laboratório de vocês de portas abertas para mim. Especial agradecimento à MSc. Fernanda, que colaborou grandemente com as análises estatísticas do presente trabalho. Meu obrigada também à minha prima, MSc. Joelma, que sempre foi tão disponível para discutir e sanar minhas dúvidas químicas. Aprendi muito com vocês e os admiro muito pelos pesquisadores e pesquisadoras que são.

Por fim, meu agradecimento ao meu órgão, a Secretaria de Estado de Educação do Distrito Federal – SEEDF, que me concedeu licença para estudos durante metade do curso do mestrado acadêmico, no qual desenvolvi a presente dissertação. Sou orgulhosa de ser servidora desse órgão que tem fundamental importância na nossa sociedade. Minha gratidão especial a minha chefe e amiga Aldeneide Rocha, que é uma educadora e gestora admirável, e a toda a equipe do Centro Educacional Darcy Ribeiro que é igualmente admirável – professores e professoras Francisco, Thiago, Edgleuba, Vinícius, Regina, Édson, Marlete, Karina, Aloma e Andrea; e Lindomar e Luiz – pelo apoio e compreensão desde antes da solicitação até a minha liberação para gozar da licença. Espero logo poder compartilhar todo meu aprendizado para a construção da escola que acreditamos.

RESUMO

Cryptococcus neoformans é um basidiomiceto caracterizado pela presença de cápsula polissacarídica. Esse fungo é o agente patogênico da criptococose, uma doença oportunista que leva a mais de 180.000 mortes anuais. Até o presente, não foram identificadas, nesse patógeno, proteínas de reparo ao dano de DNA O^6-alcilguanina (O^6-alcilG), gerado pela alcilação da posição O^6 de guaninas. O^6-alcilG leva a erro de pareamento de bases nitrogenadas, causando mutação. Análises de bioinformática (FungiDB, UniProt, BLAST e Clustal Omega) da sequência de DNA CNAG_02105 de *C. neoformans* sugeriram que essa sequência poderia codificar Atl1 (*Alkyltransferase-like protein*), proteína de reparo a O^6-alcilG. Uma vez que o hospedeiro humano não possui Atl1, uma Atl1 de *C. neoformans* poderia representar um alvo para fármacos de ação seletiva sobre esse fungo. Neste trabalho, buscou-se obter uma linhagem de *C. neoformans* mutante para o gene putativo *ATL1* (CNAG_02105), com o objetivo de caracterizar seus principais atributos de virulência e fenótipos. As linhagens *atl1*Δ não apresentaram diferenças na termotolerância, expansão da cápsula polissacarídica, melanização da parede celular, produção de urease, desenvolvimento do ciclo sexual e virulência em *Galleria mellonella* quando comparadas às linhagens controle. Não foram detectadas alterações de fenótipo de crescimento de *atl1*Δ em condições de estresse osmótico, estresse de parede celular e estresse oxidativo. Também não foi identificada sensibilidade aumentada do mutante ao agente genotóxico hidroxiureia, à exposição à radiação UV, a fluconazol e a diferentes pHs. Por outro lado, as linhagens *atl1*Δ apresentaram hipersensibilidade ao agente alcilante EMS (etil metanossulfonato), mas não a MMS (metil metanossulfonato) ou ENU (etil nitrosoureia). O EMS gera O^6-etilguanina, dano de DNA que é reparado pela proteína Atl1. Coletivamente, a bioinformática e as análises experimentais sugerem que CNAG_02105 codifica uma putativa Atl1 em *C. neoformans*.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, *Alkyltransferase-like protein*, agentes alcilantes, reparo de DNA.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is a basidiomycete characterized by the presence of a polysaccharide capsule. This fungus is the pathogenic agent of cryptococcosis, an opportunistic disease that leads to more than 180,000 annual deaths. To date, no repair proteins to the DNA damage of O^6-alkylguanine (O^6-alkylG), generated by alkylation of the position O^6 of guanines, has been identified in this pathogen. O^6-alkylG leads to mismatch of nitrogenous bases, causing mutation. Bioinformatics analyzes (FungiDB, UniProt, BLAST and Clustal Omega) of the *C. neoformans* DNA sequence CNAG_02105 suggested that this sequence could encode Atl1 (Alkyltransferase-like protein), an O^6-alkylG repair protein. Since the human host does not have Atl1, an Atl1 of *C. neoformans* could represent a target for selective action drugs on this fungus. In this work, we aimed to obtain a *C. neoformans* mutant srain for the putative *ATL1* gene (CNAG_02105), in order to characterize its main virulence attributes and phenotype. The strains *atl1*Δ did not present differences in thermotolerance, polysaccharide capsule expansion, cell wall melanization, urease production, sexual cycle development and virulence in *Galleria mellonella* when compared to control strains. No changes in *atl1*Δ growth phenotype were detected under conditions of osmotic stress, cell wall stress and oxidative stress. No increased sensitivity of the mutant to the genotoxic hydroxyurea agent, exposure to UV radiation, fluconazole and different pHs was also identified. On the other hand, the *atl1*Δ strains showed hypersensitivity to EMS (ethyl methanesulfonate), but not to MMS (methyl methanesulphonate) or ENU (ethyl nitrosourea). EMS generates O^6-ethylguanine, DNA damage that is repaired by the Atl1 protein. Collectively, bioinformatics and experimental analyzes suggest that CNAG_02105 encodes a putative Atl1 in *C. neoformans*.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, Alkyltransferase-like protein, alkylating agents, DNA repair.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de Infecção por *Cryptococcus*. 3

Figura 2: Incidência anual de infecção criptocócica por país 4

Figura 3: Representação esquemática da reprodução de *C. neoformans* 8

Figura 4: Silenciamento do transgene *SXI2*a-*URA5* durante a reprodução sexual 10

Figura 5: Representação esquemática do mecanismo de reparo de O^6-meG 14

Figura 6: Proteína Agt em diferentes espécies de fungos 16

Figura 7: Representação da estrutura das proteínas Atl e Agt ligadas a lesões de DNA 17

Figura 8: Representação esquemática do cassete *NEO* 22

Figura 9: Representação esquemática das etapas de deleção gênica 23

Figura 10: Representação esquemática da sequência de DNA CNAG_02105 23

Figura 11: Representação esquemática da sequência de DNA CNAG_02105 após a transformação 25

Figura 12: Alinhamento da proteína predita a partir da sequência de CNAG_02105 com as proteínas Agt e Atl1 que apresentaram maior similaridade de sequência em análise realizada pelo Blastp 35

Figura 13: Dendrograma da proteína predita a partir da sequência de CNAG_02105 e das proteínas Agt e Atl1 que apresentaram maior similaridade de sequência em análise realizada pelo Blastp 35

Figura 14: Alinhamento da proteína predita a partir da sequência de CNAG_02105 com as proteínas Ada, Agt e Atl1 de *E. coli*; Agt de *S. cerevisiae*; Agt de *H. sapiens* (hAgt) e Atl1 de *S. pombe* 36

Figura 15: Dendrograma da proteína predita a partir da sequência de CNAG_02105 e das proteínas Ada, Agt e Atl1 de *E. coli*; Agt de *S. cerevisiae*; Agt de *H. sapiens* (hAgt) e Atl1 de *S. pombe* 37

Figura 16: Análise eletroforética de produtos das PCRs de construção dos cassetes de deleção 39

Figura 17: Fotografia de placas de Petri contendo meio seletivo 40

Figura 18: Esquema representativo do lócus CNAG_02105 antes e após a transformação genética 40

Figura 19: Análise eletroforética de produtos das PCRs de confirmação do primeiro experimento de deleção do gene putativo *ATL1* 41

Figura 20: Análise eletroforética de produtos das PCRs de confirmação do segundo experimento de deleção do gene putativo *ATL1* 42

Figura 21: Análise eletroforética de produtos das PCRs de genotipagem do idiotipo de acasalamento e de detecção do transgene *URA5* nos isolados mutantes *atl1*Δ 43

Figura 22: Crescimento das linhagens *atl1*Δ a 30, 37 e 39ºC 44

Figura 23: Expansão da cápsula polissacarídica de linhagens *atl1*Δ 45

Figura 24: Produção de melanina por células *atl1*Δ 46

Figura 25: Produção de urease por células *atl1*Δ 47

Figura 26: Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectada com linhagens *atl1*Δ e JF289 de *C. neoformans* 48

Figura 27: Fotomicrografia da margem periférica de *spot* de cruzamento sexual entre as linhagens *atl1*Δ e H99 50

Figura 28: Crescimento das linhagens *atl1*Δ sob condições de estresse osmótico 52

Figura 29: Crescimento das linhagens *atl1*Δ sob condições de estresse de parede celular 53

Figura 30: Crescimento das linhagens *atl1*Δ sob condições de estresse oxidativo 54

Figura 31: Crescimento das linhagens *atl1*Δ em diferentes pHs 56

Figura 32: Crescimento das linhagens *atl1*Δ em meio YPD contendo fluconazol 57

Figura 33: Crescimento das linhagens atl1Δ após exposição à radiação UV 58

Figura 34: Crescimento das linhagens *atl1*Δ em meio YPD contendo hidroxiureia 59

Figura 35: Crescimento das linhagens *atl1*Δ em meio YPD contendo os agentes alcilantes MMS e ENU 60

Figura 36: Crescimento das linhagens *atl1*Δ em meio YPD contendo o agente alcilante EMS 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores de polimerização utilizados para geração dos fragmentos dos cassetes de deleção gênica.....22

Tabela 2: Iniciadores de polimerização utilizados nas PCRs de confirmação de mutantes *atl1*Δ 25

Tabela 3: Iniciadores de polimerização utilizados nas PCRs de genotipagem do idiotipo de acasalamento e detecção do transgene *URA5*.....26

Tabela 4: Condições estressoras.....31

Tabela 5: Agentes alcilantes.....32

Tabela 6: Proteínas Agt e Atl1 que demonstraram maior similaridade com a predita proteína codificada por CNAG_02105 em análise no Blastp.....34

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SÍMBOLOS

~	Aproximadamente
Δ	Mutante
5-FOA	Ácido 5-fluorótico
A	Adenina
Aa	Aminoácido(s)
Agt	Proteína O^6-alcilguanina-DNA alciltransferase
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Atl	*Alkyltransferase-like protein*
Atl1	*Alkyltransferase-like protein* 1
***atl1*Δ**	Mutante para o gene putativo *ATL1*
Blastn	*Nucleotide BLAST*
Blastp	*Protein BLAST*
C	Citosina (nucleotídeo) ou cisteína (aminoácido)
C-Ada	Extremidade carboxi-terminal (C-terminal) da proteína ADA
CpG	Citosina seguida de guanina
DNMT	DNA metiltransferase
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EMS	Etil metanossulfonato
ENU	Etil nitrosourea
e-value	Valor de expectativa
FA	Meio de cultura Filamentação Ágar
Fwd	*Foward*
G	Guanina
gDNA	DNA genômico
H	Hora(s)
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
hAgt	Proteína O^6-alcilguanina-DNA alciltransferase humana
HCl	Ácido clorídrico
HDAC	Histona desacetilase
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HU	Hidroxiurea

kb	Quilobase
KCl	Cloreto de potássio
L-dopa	L-3,4-dihidroxifenilalanina
M	Molar
MAT	Lócus *mating-type*
mg	Miligrama(s)
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
Mgmt	Proteína O^6-metilguanina-DNA metiltransferase, sinônimo de AGT
mL	Mililitro(s)
mM	Milimolar
MM	Meio mínimo
MMR	*Mismatch repair*, reparo de pareamentos errados
MMS	Metil metanossulfonato
MS	Meio de cultura Marashige & Skoog
NaCl	Cloreto de sódio
N-Ada	Extremidade amino-terminal (N-terminal) da proteína ADA
NaOH	Hidróxido de sódio
NAT	Noursetricina
NEO	Neomicina
NER	*Nucleotide excision repair*, reparo por excisão de nucleotídeos
ng	Nanograma(s)
nt	Nucleotídeos
***O^6*-alcilG**	O^6-alcilguanina
***O^6*-etG**	O^6-etilguanina
***O^6*-meG**	O^6-metilguanina, dado de DNA causado por metilação de G na posição O^6
***O^6*-meG:T**	O^6-metilguanina:timina, O^6-meG pareada com timina
ºC	Grau(s) celsius
ORF	*Open reading frame*, região codificadora
PAMP	Padrões moleculares associados ao patógeno
pb	Pares de base
PBS	*phosphate buffered salline*, tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões

Rev	*Reverse*
RNAi	RNA de interferência
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
siRNA	*Small interfering RNA,* pequeno RNA de interferência
SIS	Silenciamento sexo-induzido
SNC	Sistema nervoso central
T	Timina
TA	Temperatura de anelamento de iniciador de polimerização
TM	*Melting temperature*, temperatura de fusão de iniciador de polimerização
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
ura–	Auxotrófico para uracila
ura+	Capaz de crescer na ausência de uracila
W	Triptofano
WT	W*ide type*, linhagem selvage
YPD	Meio de cultura *Yeast extract - Peptone - Dextrose*
α	Alfa
µg	Micrograma(s)
µL	Microlitro(s)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 2
1.1 *Cryptococcus neoformans* 2
1.2 Criptococose 2
1.3 Fatores de virulência de *C. neoformans* 5
1.3.1 Termotolerância 5
1.3.2 Cápsula polissacarídica 6
1.3.3 Melanização da parede celular 6
1.3.4 Atividade de urease 7
1.4 Reprodução 7
1.5 Linhagem JF289 9
1.6 Sequência de DNA CNAG_02105 11
1.7 O^6-alcilguanina-DNA alciltransferase 13
1.8 *Alkyltransferase-like protein* 17
2. OBJETIVOS 19
2.1 Objetivo geral 19
2.2 Objetivos específicos 19
3. JUSTIFICATIVA 20
4. METODOLOGIA 21
4.1 Anotação e classificação do gene CNAG_02105 21
4.2 Linhagens e condições de cultura de *C. neoformans* 21
4.3 Deleção gênica 22
4.4 Genotipagem do idiotipo de acasalamento e detecção do transgene *URA5* 26
4.5 Condições de reações de PCR 26
4.5.1 Taq DNA Recombinant (Invitrogen) 26
4.5.2 LongAmp Taq DNA Polymerase (New England Biolabs) 27
4.5.3 OneTaq DNA Polymerase (New England Biolabs) 28
4.6 Avaliação dos fatores de virulência 28
4.6.1 Avaliação de termotolerância 29
4.6.2 Expansão da cápsula polissacarídica 29
4.6.3 Ensaio de melanização da parede celular 29
4.6.4 Avaliação da produção de urease 30
4.7 Avaliação da virulência no modelo de larvas de *Galleria mellonela* 30

4.8 Avaliação da formação de hifas de acasalamento e do desenvolvimento do ciclo sexual 31
4.9 Teste de sensibilidade a condições estressoras e a agentes alcilantes 31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 34
5.1 A CNAG_02105 codifica Atl1 putativa em *C. neoformans* 34
5.2 Linhagens mutantes *atl1*Δ 38
..... 39
5.3 *ATL1* não é requerido para a expressão dos fatores de virulência em *C. neoformans in vitro* 44
5.4 *ATL1* não é requerido para a virulência de *C. neoformans* em *G. mellonella* 48
5.5 *ATL1* não é requerido para o estabelecimento do ciclo sexual em *C. neoformans* 49
5.6 As linhagens *atl1*Δ apresentam resposta semelhante a de linhagens selvagens a diferentes condições de estresse 51
5.7 As linhagens *atl1*Δ apresentam resposta semelhante a de linhagens selvagens aos agentes mutagênicos radiação UV e hidroxiurea 57
5.8 Mutantes *atl1*Δ apresentam sensibilidade aumentada ao agente alcilante EMS 59
6. CONCLUSÃO 64
7. PERSPECTIVAS 65
REFERÊNCIAS 66

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans é um fungo distribuído mundialmente e foi primeiramente descrito por pesquisadores alemães e italianos em 1894 (BUSSE, 1894; SANFELICE, 1894 apud DOERING, 2000; SRIKANTA et al, 2014; MAY et al., 2016). *C. neoformans*, normalmente leveduriforme e haploide, apresenta reprodução assexual (crescimento vegetativo) e o ciclo sexual. Na natureza, é encontrado em árvores, vegetais em decomposição, no solo e, principalmente, em excretas de aves, especialmente pombos. O basidiomiceto *C. neoformans* produz colônias mucoides de cor branca quando crescidos em ágar e é caracterizado pela presença de cápsula polissacarídica que envolve sua célula. *C. neoformans*, juntamente com *C. gattii*, são os dois agentes patogênicos que causam a criptococose.

1.2 Criptococose

A criptococose é uma doença oportunista que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos (KERKERING et al., 1981), como os portadores de HIV/AIDS, pacientes submetidos à quimioterapia ou transplantados tratados com imunossupressores; e está associada a altos custos de tratamento e elevada letalidade.

A doença era atribuída a uma única espécie de fungo: *C. neoformans*. Porém, métodos moleculares mais refinados levaram à identificação de uma variedade do patógeno, *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, que foi classificada posteriormente como a espécie distinta *Cryptococcus gattii* (sorotipos B e C) (KWON-CHUNG et al., 2002).

Apesar de ser predominantemente uma doença de pacientes com função imunológica comprometida, um surto de criptococose em indivíduos imunocompentetes entre 1999 e 2002, na ilha de Vancouver, Canadá, chamou a atenção sobre a capacidade de *C. gattii* atuar como agente patogênico nesses hospedeiros (HOANG et al., 2004). Em estudo realizado na Austrália e Nova Zelândia entre 1994 e 1997, foi verificado que 98% dos casos de criptococose causada por *C. neoformans* ocorriam em pacientes imunocomprometidos, enquanto 44% das infecções por *C. gattii* ocorriam em hospedeiros imunocompetentes (CHEN et al., 2000).

C. neoformans é classificado em duas variedades: *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans* (FRANZOT et al., 1999). *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) é a variedade de *C. neoformans* mais comumente isolada em amostras clínicas em todo o mundo (BENNET et al., 1977), enquanto a *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) é caracterizada por baixa patogenicidade e por apresentar menor termotolerância (MARTINEZ et al., 2001). No Brasil, o sorotipo A também é o mais prevalente (77,95%), seguido pelo sorotipo B (18,2%) (NISHIKAWA et al., 2003).

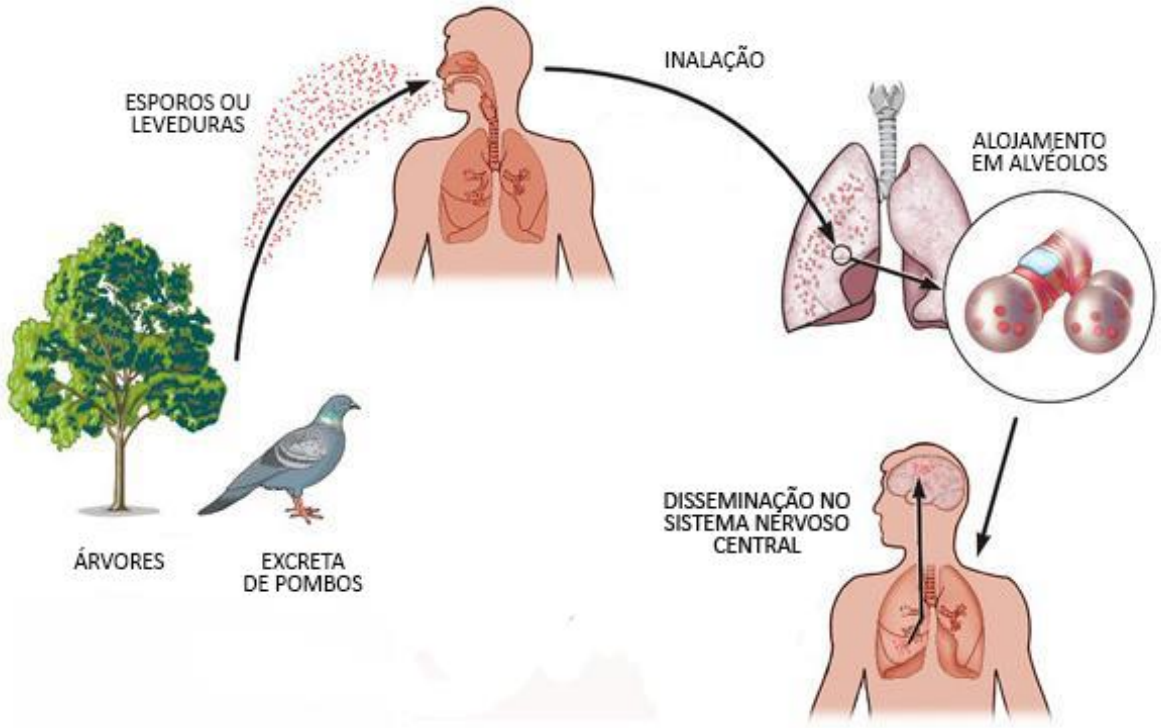


Figura 1: Ciclo de Infecção por *Cryptococcus*. *Cryptococcus*, na natureza, pode ser encontrado em excretas de pombos ou em árvores. A infecção se dá pela inalação de partículas infecciosas, como leveduras ou esporos. Não sendo erradicada a infecção, o fungo então se aloja nos alvéolos pulmonares, onde pode se proliferar. A doença pode disseminar e chegar ao sistema nervoso central, evoluindo para a meningite criptocócica. Fonte: adaptado de HULL & HEITMAN, 2002.

A infecção por *Cryptococcus* ocorre pela via respiratória, por meio da inalação de partículas infecciosas, como pequenas leveduras dessecadas ou basidiósporos presentes no ambiente. Atingindo os alvéolos pulmonares, o fungo pode se proliferar (Figura 1). No pulmão, macrófagos pulmonares são as principais células fagocíticas e, portanto, as primeiras células do sistema imune a defender o hospedeiro contra esse patógeno (FELDMESSER et al., 1998). No entanto, *C. neoformans* é um patógeno intracelular facultativo, capaz de sobreviver e se replicar intracelularmente *in vitro* (DIAMOND & BENNETT, 1973; TUCKER & CASADEVALL, 2002) e *in vivo* (FELDMESSER et al., 2000). A habilidade

desse patógeno de sobreviver no interior de macrófagos provavelmente contribui para as infecções crônicas e latentes (CASADEVALL et al., 2003), além de permitir que o fungo se propague para o resto do organismo. O fungo pode se disseminar através da circulação sanguínea e praticamente qualquer órgão pode ser infectado, como articulações, pele, olhos, trato urinário e fígado (CUELLAR et al., 1992; DURDEN & ELEWSKI, 1994; SEATON et al., 1997; SOBEL & VAZQUEZ, 1999; NARA et al., 2008 apud VECCHIARELLI et al., 2013). A infecção cutânea geralmente reflete doença disseminada, embora raramente também ocorram casos de criptococoses cutâneas primárias (CHRISTIANSON et al., 2003). *C. neoformans* pode chegar inclusive ao sistema nervoso central (SNC), causando a meningite criptocócica, o quadro clínico mais grave da doença (Figura 1). Para chegar ao SNC, esse patógeno precisa atravessar a barreira hematoencefálica. Para isso, *C. neoformans* utiliza, juntamente com outros mecanismos envolvendo leveduras livres, o método "Cavalo de Troia", no qual as células fúngicas atravessam a barreira hematoencefálica dentro de monócitos do hospedeiro (CHARLIER et al., 2009).

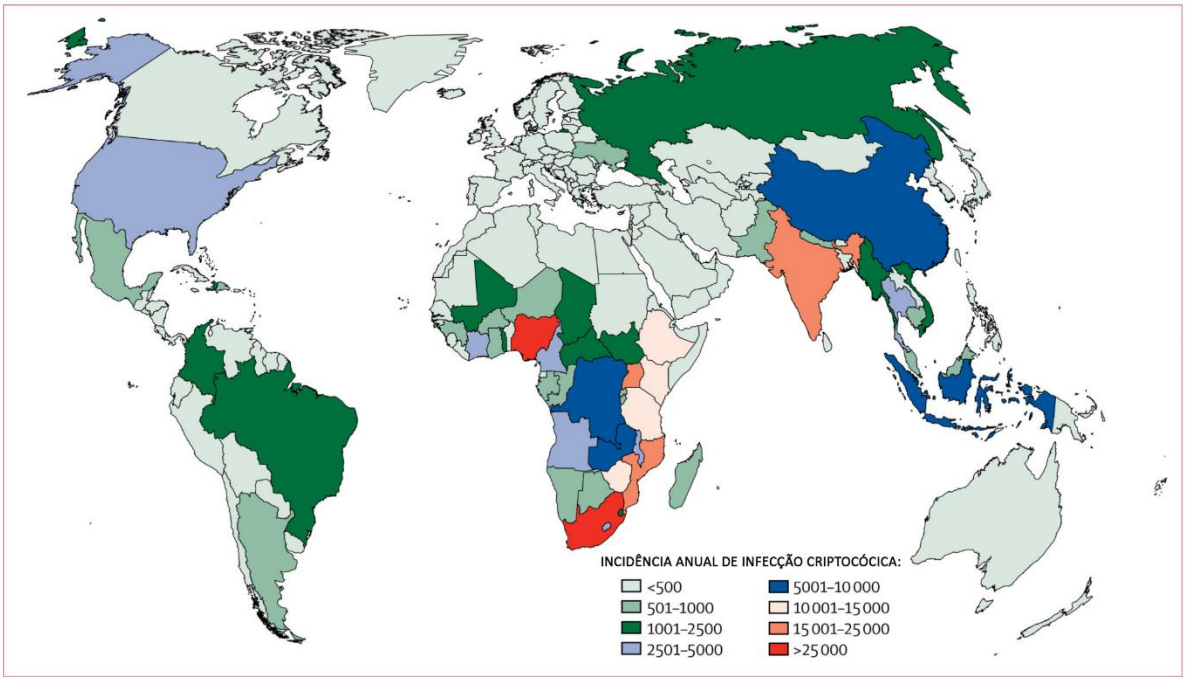


Figura 2: Incidência anual de infecção criptocócica por país. Dados de 2014. No mundo, estimou-se um total de 278.000 pessoas positivas para antigenemia criptocócica em 2014. Fonte: adaptado de RAJASINGHAM et al., 2017.

Em hospedeiros imunocompetentes, acredita-se que a maioria das infecções primárias sejam assintomáticas e comuns: estudos sorológicos de Chen e colaboradores (1999)

demonstraram a presença de anticorpos reativos a proteínas de *C. neoformans* na maioria dos indivíduos saudáveis. O desenvolvimento da doença, uma vez ocorrida a infecção e não erradicada, dependerá da resposta do sistema imune do hospedeiro: pode se tornar latente com o patógeno contido em granulomas (podendo, entretanto, ser reativada depois), ou evoluir para a sua forma aguda (PERFECT & CASADEVALL, 2002) que é fatal quando não tratada.

Estima-se que mais de 223 mil casos de meningite criptocócica ocorram a cada ano no mundo (RAJASINGHAM et al., 2017), dos quais cerca de 70% ocorrem na África Subsaariana (Figura 2) (PARK et al., 2009; VALLABHANENI et al., 2015; RAJASINGHAM et al., 2017). Em 2014, essa doença resultou em 181.100 mortes, e 75% delas ocorreram na África Subsaariana (RAJASINGHAM et al., 2017). Nos pacientes portadores de HIV/AIDS, a meningite criptocócica é a infecção fúngica mais comum no sistema nervoso central e a terceira mais comum complicação neurológica nestes pacientes (VALLE & PIÑA-OVIEDO, 2006), causando 15% das mortes relacionada à AIDS (RAJASINGHAM et al., 2017).

1.3 Fatores de virulência de *C. neoformans*

C. neoformans apresenta fenótipos específicos que conferem vantagem à sobrevivência e proliferação no organismo do hospedeiro. Uma hipótese para a seleção e evolução de certos fatores de virulência é o escape à predação por organismos de solo, como amoebas e nematoides (CASADEVALL et al., 2003).

1.3.1 Termotolerância

A grande maioria das espécies de fungos possui crescimento ótimo entre 25 e 35°C. Apenas alguns fungos apresentam termotolerância, que consiste na capacidade de crescer entre 35 e 40°C. Essa característica é um pré-requisito para que um microrganismo seja capaz de proliferar e provocar doença em hospedeiros mamíferos (PERFECT, 2006).

1.3.2 Cápsula polissacarídica

A cápsula que envolve a superfície celular de *C. neoformans* é constituída de dois principais polissacarídeos: glicuronoxilomanana (GXM), que corresponde a aproximadamente 90% da massa total da cápsula; e glicuronoxilomanogalactana (GXMGal) (HEISS et al., 2009), que corresponde a cerca de 7% dessa massa (DOERING, 2000). A cápsula é induzida por diversas condições, como mudanças no pH, elevados níveis de CO_2 (GRANGER et al., 1985) e privação de ferro (VARTIVARIAN et al., 1993).

Fungos patógenos são normalmente percebidos pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) das células do sistema imune do hospedeiro, que reconhecem os padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) e induzem a transdução de sinal que coordena processos imunes inatos, como fagocitose e produção de citocinas. PAMPs comuns de fungos incluem componentes da parede celular, como β-glicanas ou mananas (CROSS & BANCROFT, 1995). *C. neoformans* fornece um desafio aos PRRs, uma vez que sua cápsula polissacarídica mascara esses potenciais PAMPs (HEUNG, 2017). Dessa forma, a cápsula auxilia o fungo a escapar da ação de células do sistema imune, inibindo a fagocitose (MITCHELL & FRIEDMAN, 1972 apud SMALL & MITCHELL, 1989). Linhagens acapsuladas são fagocitadas três vezes mais efetivamente por leucócitos humanos (BULMER & SANS, 1967) e se demonstraram avirulentas em camundongos (FROMTLING et al., 1982).

Tanto GXM quanto GXMGal afetam o sistema imune do hospedeiro. A acumulação de GXM dentro de macrófagos desregulam a secreção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (VECCHIARELLI et al., 1996; MONARI et al., 2005) e inibem a proliferação de células T (MONARI et al., 2006). GXMGal, por sua vez, induz a apoptose de macrófagos (VILLENA et al., 2008; PERICOLINE et al., 2009), produz efeito inibitório da resposta mediada por células T (COLLINS & BANCROFT, 1991) e mostrou-se essencial para a virulência em *C. neoformans* (MOYRAND et al., 2007).

1.3.3 Melanização da parede celular

A melanina é um polímero pigmentado de coloração escura, hidrofóbico e insolúvel em fluídos aquosos ou orgânicos, com carga negativa e resistente a ácidos (revisto por NOSANCHUK & CASADEVALL, 2006). Muitos fungos sintetizam melanina constitutivamente, outros, facultativamente, como é o caso de *C. neoformans* que o faz na

presença dos precursores apropriados. Em meio contendo substratos fenólicos, como L-dopa, células de *C. neoformans* sintetizam e acumulam tal pigmento (WANG et al., 1995). Esse polímero proporciona vantagens de sobrevivência aos microrganismos, pois protege as células contra estresse oxidativo (JACOBSON & TINNEL, 1993), radiação de alta energia (MAY et al., 2016), ação de antifúngicos (WANG et al., 1995), degradação enzimática e toxicidade de metais pesados (revisto por GÓMEZ & NOSANCHUK, 2003). A melanização pode inclusive modificar a resposta imune do hospedeiro à infecção: linhagem mutante de *C. neoformans* deficiente na síntese de melanina mostrou-se menos virulenta em camundongos, e células melanizadas apresentaram maior resistência a fagocitose e efeitos antifúngicos de macrófagos murinos (WANG et al., 1995).

1.3.4 Atividade de urease

A urease, que catalisa a hidrólise da ureia em amônia e carbamato, é uma importante enzima hidrolítica produzida por *C. neoformans* e diversos outros fungos patogênicos humanos. Cox e colaboradores (2000) demonstraram que mutantes para o gene *URE1* de *C. neoformans* são hipovirulentos. Essa enzima ativa promove acumulação de células dentríticas imaturas e uma resposta imune Th2 não-protetora no pulmão (OSTERHOLZER et al., 2009) e também atua na invasão do SNC por *C. neoformans* (SINGH et al., 2013).

1.4 Reprodução

C. neoformans ocorre principalmente na forma de levedura, tanto no meio ambiente como durante o curso da infecção (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992b; FU et al., 2011). A sua reprodução é predominante clonal, por brotamento. Há evidências de que a reprodução sexual ocorra na natureza (LITVINTSEVA et al., 2005) e pode ser induzida *in vitro* (KWON-CHUNG, 1975; 1976; FU et al., 2011).

A reprodução sexual do basidiomiceto *C. neoformans* é orquestrada pelo lócus *mating-type* (*MAT*), que existe em dois alelos, **a** e α. Dessa forma, *C. neoformans* apresenta dois idiotipos sexuais distintos: *mating type* **a** (*MAT***a**) e *mating type* α (*MAT*α). O lócus *MAT* desse fungo é único e contêm mais de 20 genes, que codificam homólogos a reguladores do desenvolvimento sexual de outros fungos e outras proteínas com nenhuma função óbvia no acasalamento (LENGELER et al., 2002).

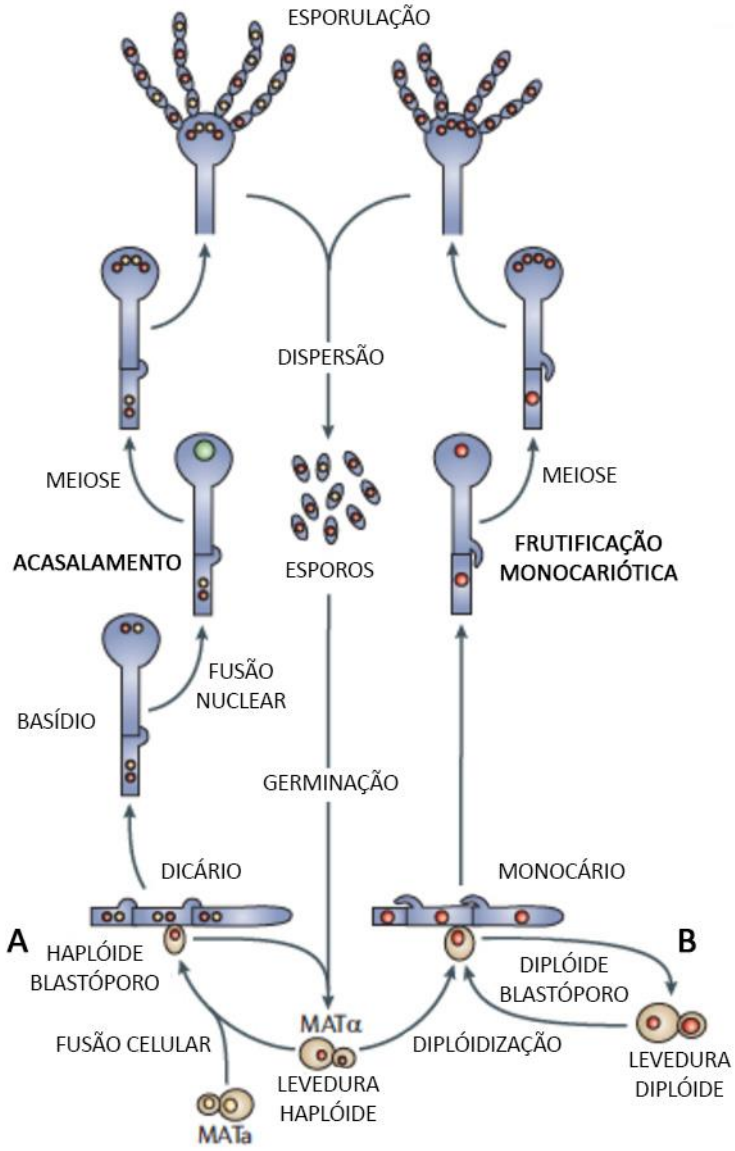


Figura 3: Representação esquemática da reprodução de *C. neoformans.* Esporos resultam de **A.** acasalamento por fusão de células de idiotipos de acasalamento opostos (*MAT***a** e *MATα*) e subsequente formação de dicário; ou de **B.** acasalamento unissexual de células *MAT***a** ou *MATα* e estabelecimento de células monocarióticas. Em ambos casos, segue-se meiose e esporulação. Os esporos germinam e produzem células haploides e leveduriformes que se dividem por brotamento. Fonte: adaptado de KRONSTAD et al., 2011.

Durante a reprodução sexual, células *MAT***a** e *MATα* se fundem para formar uma célula dicariótica *MAT***a** + *MATα* que se diferencia em hifa dicariótica. Essa hifa eventualmente produzirá basídio com núcleos diploides (*MAT***a** e *MATα* fundidos), que sofrem meiose e se dividem mitoticamente para formar as quatro cadeias de esporos do basidiósporo (KWON-CHUNG, 1975; 1976; FU et al., 2011) (Figura 3A). Um segundo tipo de hifa também pode ser produzido na ausência de idiotipos sexuais diferentes e é chamada de frutificação haploide ou monocariótica (*MAT***a** + *MAT***a** ou *MATα* + *MATα*) (WICKES et al.,

1996; TSCHARKE et al., 2003; FU et al., 2011), sendo essa, no entanto, mais rara (Figura 3B).

O lócus *MAT* de *C. neoformans* é de especial interesse, pois o idiotipo sexual está relacionado à virulência. Diferentemente dos isolados diploides **a**/α, que são predominantemente estéreis, a maioria das linhagens do surto de criptococose em Vancouver são exclusivamente do idiotipo de acasalamento α, evidenciado como o mais virulento (KWON-CHUNG et al., 1992a), férteis e decorrentes de eventos de recombinação recentes (FRASER et al., 2003). Além disso, o ciclo sexual está relacionado à geração de diversidade genética e plasticidade fenotípica em fungos (NI et al., 2013) e, quando há a formação de hifas de acasalamento, os basidiósporos infecciosos produzidos podem ser prontamente inalados e gerar quadro infeccioso em novo hospedeiro (SUKROONGREUNG et al., 1998).

1.5 Linhagem JF289

A linhagem de *C. neoformans* JF289 foi gerada a partir da linhagem *MAT***a** *ura5* JF99, isolada como um mutante espontâneo auxotrófico para uracila (ura–) de KN99**a** por seleção em ácido 5-fluorótico (5-FOA) (NICHOLS et al., 2004). No lócus *URA5* endógeno, a substituição de guanina (G) por adenina (A) resulta em substituição conservada de aspartato (Asp) por valina (Val) na posição 225, o que confere essa resistência a 5-FOA. Na construção da linhagem JF289, inicialmente foi feita a deleção do gene *SXI2***a** do lócus de origem *MAT* em JF99, por transformação por biolística com o cassete de deleção *SXI2***a**::*NAT*; e, posteriormente, o gene *SXI2***a** foi realocado no lócus *URA5*, localizado em outro cromossomo, gerando o transgene *SXI2***a**-*URA5* (Figura 4) (HSUEH et al., 2008). Análise por *Southern blot* demonstrou que múltiplas cópias de *SXI2***a** foram integradas *in tandem* no lócus *URA5* de JF289 (HSUEH et al., 2008).

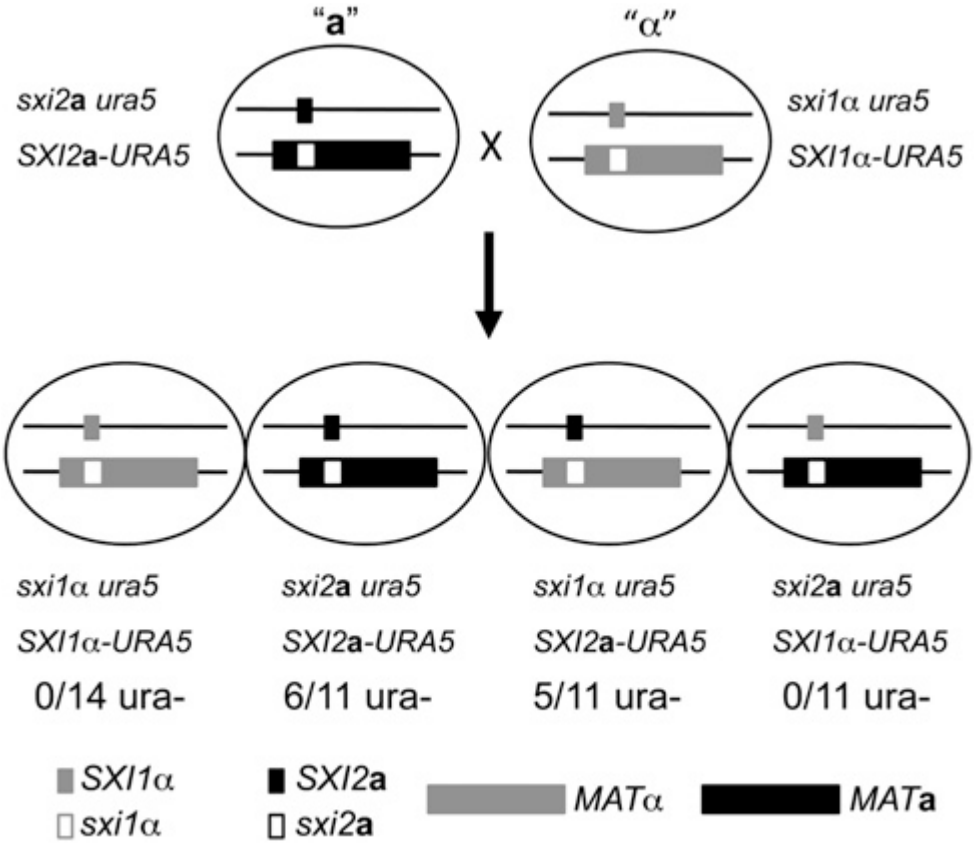


Figura 4: Silenciamento do transgene *SXI2*a-*URA5* durante a reprodução sexual. Os genes homeodomínios *SXI1α* e *SXI2***a** foram deletados do lócus *MAT* (retângulos grandes cinzas e pretos, respectivamente) e cópias dos genes selvagens foram integradas no lócus *URA5* (quadrados pequenos cinzas e pretos). A progênie total obtida é indicada de acordo com o genótipo apresentado, seguido pelo número de progênies auxotróficas para uracila. Fonte: adaptado de WANG et al., 2010.

Em 2010, Wang e colaboradores, afim de estudar o ciclo sexual de *C. neoformans*, realizaram cruzamento entre JF289 (**a**) e a linhagem JF306 (α) (HSUEH et al., 2008), na qual o gene *SXI1*α também havia sido deletado do lócus *MAT* e realocado no lócus *URA5*, gerando, por sua vez, o transgene *SXI1*α*-URA5* (Figura 4). Quando feito esse acasalamento, 11 de 48 isolados da geração F1 mostraram-se auxotróficos para uracila, o que não era esperado, já que ambas linhagens parentais possuíam o alelo selvagem *URA5* e, portanto, toda a progênie deveria ser capaz de crescer na ausência desse aminoácido (ura+). Análise por PCR e *Southern blot* demonstraram que toda a progênie ura– portava uma versão intacta do alelo *SXI2***a**-*URA5*, oriunda da linhagem parental JF289 e, portanto, o fenótipo não poderia ser atribuído à perda de integração de *URA5* (Figura 4).

Como *SXI2***a**-*URA5* estava presente na progênie ura–, sugeriu-se que tanto as três cópias do transgene como a cópia endógena apresentando a mutação pontual estavam sendo silenciadas. Transcritos *URA*5 não foram detectados por análise de *Northern blot* de isolados

ura– e experimentos de RNAPol-ChiP sugeriram que *URA*5 estava sendo transcrito nas linhagens ura– nos mesmos níveis que em ura+. Desse modo, o silenciamento sexo-induzido (SIS) desse transgene é evento pós-transcricional. O silenciamento não se propagou ao lócus *MAT*, pois as linhagens ura– demonstraram ser férteis em cruzamentos sexuais. Demonstrou-se ainda que o silenciamento do transgene *URA*5 também ocorria durante a proliferação mitótica das linhagens transformadas, ainda que em uma frequência muito mais baixa (1 a 3 x 10^{-3}). Ambos os silenciamentos meiótico ou mitótico do transgene são instáveis e podem reverter ao fenótipo ura+.

O genoma de *C. neoformans* codifica uma Argonauta (Ago1), duas Dicers (Dcr1 e Dcr2) e uma RNA Polimerase RNA-dependente (Rdp1) (LOFTUS et al., 2005 apud WANG et al., 2010), proteínas da maquinaria de silenciamento por RNA de interferência (RNAi). Os genes correspondentes foram individualmente deletados em linhagens *MAT***a** e *MAT*α, os mutantes obtidos foram utilizados em cruzamentos sexuais e a progênie foi analisada. Os resultados demonstraram que *RDP1*, *AGO1*, *DCR2* e, em menor extensão, *DCR1* são requeridas para SIS, tanto no silenciamento mitótico como no meiótico. Análises por *Northern blot* também demonstraram que siRNAs (pequenos RNAs de interferência) derivados de *URA5* estavam presentes apenas em linhagens ura– e a grande maioria era antisenso. Assim, constatou-se que a linhagem JF289 sofre silenciamento do transgene *URA5* por meio do mecanismo epigenético de RNAi.

1.6 Sequência de DNA CNAG_02105

A sequência de DNA CNAG_02105 de *C. neoformans*, localizada no cromossomo 6, 1174177 - 1174998 (+), está anotada em bancos de dados genômicos e proteicos como sequência codificadora da proteína putativa *Methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase* (FungiDB <http://fungidb.org>, Uniprot <http://uniprot.org>, NCBI *Protein* <https://ncbi.nlm.nih.gov/protein>: acessados em 31/03/2018). Por representar uma provável proteína com atividade metiltransferase, essa sequência chamou a atenção do nosso grupo de pesquisa, cujo foco é o estudo da epigenética de fungos.

Epigenética, palavra que se origina do prefixo grego *epi*, que significa além e acima de algo, foi introduzida pelo geneticista e embriologista britânico Conrad Hal Waddington em 1942. O conceito foi refinado desde então e, hoje, é compreendido como sendo as alterações herdáveis do padrão de expressão de genes que não envolvem mudanças na sequência de

DNA (JABLONKA & LAMB, 2002). Existem vários mecanismos epigenéticos, como, principalmente, acetilação de histonas e a metilação do DNA. Esses dois mecanismos alteram a acessibilidade do DNA e a estrutura da cromatina, que varia entre estados condensado e inativo (heterocromatina) ou descondensado e ativo (eucromatina) (revisto por KOUZARIDES, 2007), regulando, assim, os padrões de expressão de genes.

A acetilação é a modificação pós-traducional de histonas que tem o maior potencial para abrir a cromatina (revisto por KOUZARIDES, 2007) e é um mecanismo altamente dinâmico, regulado por duas classes de enzimas chamadas histona acetiltransferases, que transferem grupos acetila à cauda N-terminal das histonas, e histona desacetilases (HDACs), que exercem função oposta, removendo este grupo acetila da cauda das histonas. O grupo acetila reduz a carga positiva dos resíduos de lisina, levando assim à redução da afinidade entre a histona e o DNA. Dessa forma, o DNA se abre e se torna acessível a fatores de transcrição e polimerases. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que os inibidores químicos de HDACs Butirato de Sódio e Tricostatina A alteram a expressão dos principais fenótipos de virulência em *C. neoformans* (BRANDÃO et al., 2015). Igualmente, mutantes de *C. neoformans* para oito genes de HDAC caracterizados apresentaram fatores de virulência alterados (BRANDÃO et al., 2018), indicando que a acetilação/desacetilação de histonas é um mecanismo epigenético que está envolvido na regulação da virulência nesse patógeno.

A metilação do DNA, por sua vez, foi o primeiro e mais importante mecanismo epigenético elucidado (HOLLIDAY & PUGH, 1975; RIGGS, 1975; HOLLIDAY, 2006) e consiste no processo bioquímico no qual um grupo metila é adicionado à molécula de DNA. A reação é catalisada por enzimas conhecidas por DNA metiltransferases (DNMTs) e ocorre no carbono de quinta posição de citosinas seguidas por guaninas na sequência de DNA (ilhas CpG). Em geral, o DNA metilado reprime a expressão gênica: obstrui a ligação de fatores de transcrição aos elementos regulatórios do gene; ou pode se ligar a proteínas do domínio de ligação a metil-CpG que, por sua vez, recrutam proteínas repressoras como HDAC e fatores de remodelação da cromatina. A metilação de DNA é uma característica de diversos organismos eucariotos. Em *C. neoformans*, no entanto, esse mecanismo ainda não é consenso. Huff e Ziberman (2014) publicaram que *Cryptococcus neoformans* exibe metilação CG, que é completamente perdida em linhagens com deleção do gene *DNMT5*, único homólogo de DNA metiltransferase presente no seu genoma, sugerindo fortemente que DNMT5 seja uma DNA metiltransferase CG-específica. Além disso, a perda de DNMT5 causa diminuição da

infecciosidade de *C. neoformans* em camundongo (LIU et al., 2008 apud HUFF & ZIBERMAN, 2014).

Esperava-se que a provável proteína codificada por CNAG_02105 estaria envolvida com o mecanismo epigenético de metilação de DNA, podendo representar outra proteína com atividade DNA metiltransferase. No entanto, verificou-se que a proteína putativa codificada por CNAG_02105, *Methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase*, é também conhecida como O^6-alcilguanina-DNA alciltransferase (Agt) ou O^6-metilguanina-DNA metiltransferase (Mgmt) (IntEnz: EC 2.1.1.63 <http://www.ebi.ac.uk/intenz/>, acessado em 31/03/2018). Essa proteína, doravante chamada de O^6-alcilguanina-DNA alciltransferase (Agt), é, na verdade, relacionada ao reparo de DNA contra alcilação.

1.7 O^6-alcilguanina-DNA alciltransferase

O DNA é constantemente alvo de agentes mutagênicos ambientais e celulares. Por isso, os organismos desenvolveram vários mecanismos que reconhecem e reparam modificações químicas no DNA (MOORE et al., 1994). Os agentes alcilantes, compostos quimicamente reativos, com ação não específica, que podem gerar espécies eletrofílicas (grupo alcila) que vão formar ligações covalentes com grupos nucleofílicos biologicamente importantes existentes nos ácidos nucleicos e nas proteínas, são uma classe desses agentes mutagênicos. Agentes alcilantes, como os metilantes, podem gerar derivados de base que induzem pareamento errado e lesões que bloqueiam a replicação do DNA (LINDAHL et al., 1988). O principal efeito mutagênico de agentes alcilantes no DNA é a formação de O^6-alcilguanina, como O^6-metilguanina (O^6-meG), que consiste na metilação da guanina (G) na posição O^6 (COULONDRE & MILLER, 1977; SCHENDEL & ROBINS, 1978; GORDON et al., 1990 apud MOORE et al., 1994). A base modificada O^6-meG pareia com timina (T), induzindo assim a troca da base nitrogenada G, que sofreu metilação, por adenina (A) e resultando em mutação por transição G:C/A:T (Figura 5) (PEGG, 2000; TUBBS & TAINER, 2010).

O dano O^6-meG pode levar inclusive a morte celular por apoptose, por mecanismos que dependem da atividade do sistema de reparo de pareamentos errados (*mismatch repair*, MMR) (KAT et al., 1993; TAKAGI et al., 2003; TUBBS et al., 2007). MMR reconhece O^6-metilguanina:timina (O^6-meG:T) como um erro de pareamento e remove somente a T; isso causa um ciclo inútil de renovação e síntese de nucleotídeos (nt) que gera quebra de fita

simples e fita dupla do DNA, levando a apoptose (Figura 5) (KARRAN, 2001; YORK et al., 2006; TUBBS et al., 2007).

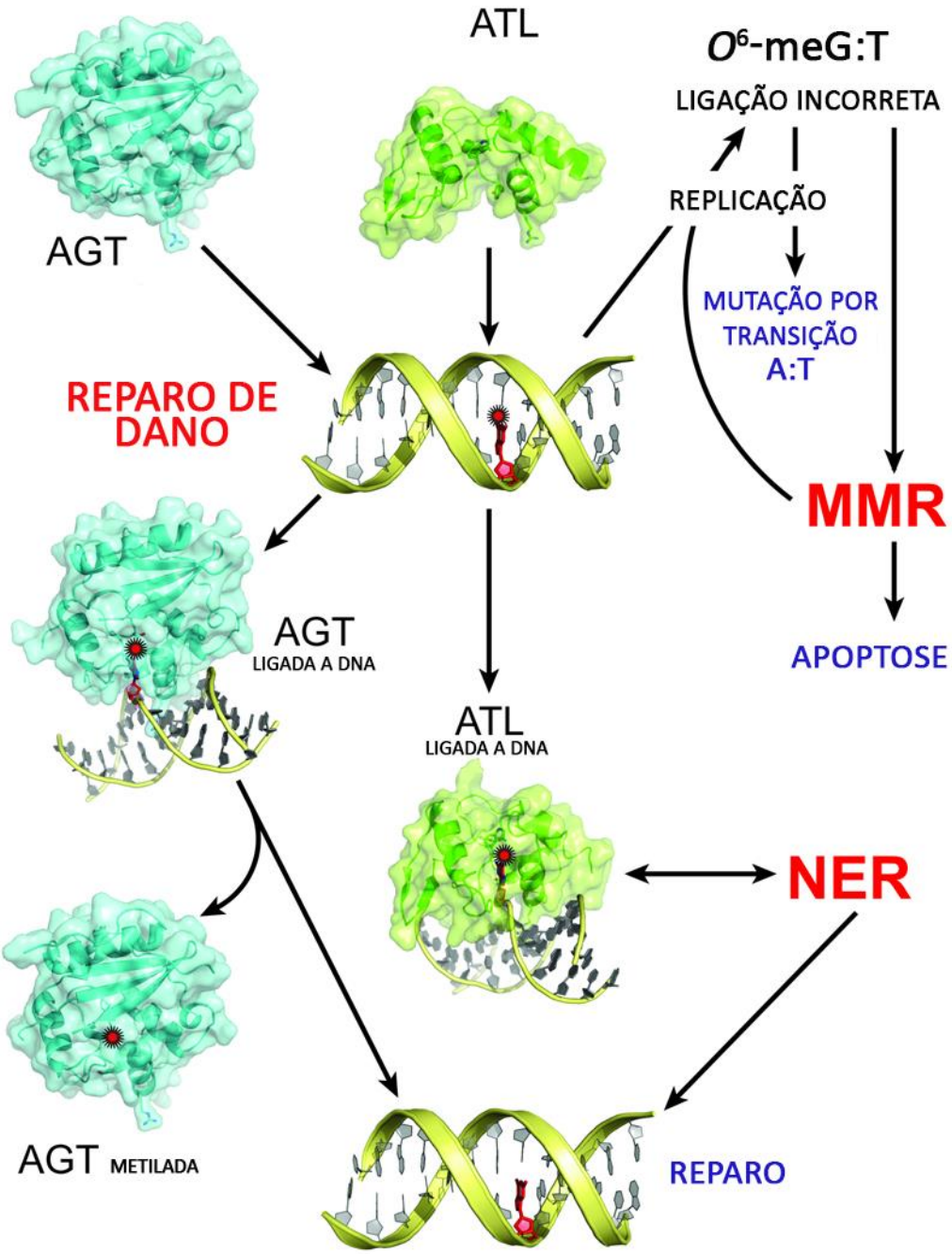


Figura 5: Representação esquemática do mecanismo de reparo de *O*^{6}-meG. O dano ao DNA causado pela formação de *O*^{6}-meG provoca uma ligação incorreta da base G metilada com T e, consequentemente, leva à mutação por transição G:C/A:T. O reparo desse dano pode ocorrer pela ação da proteína Agt; pela ação da proteína Atl, que desempenha um papel na via NER de reparo; ou pela via MMR de reparo, que leva à apoptose. Fonte: adaptado de TUBBS & TAINER, 2010.

A Ada de *Escherichia coli* é uma proteína-chave na resposta contra os agentes alcilantes e tem sido amplamente estudada nas últimas décadas. Essa proteína é bifuncional e possui dois domínios principais: o domínio amino-terminal (N-terminal, N-Ada), que desmetila metilfosfodiésteres de DNA pela transferência irreversível do grupo metila para o resíduo Cys-38 da enzima (DEMPLE et al., 1985 apud MOORE et al., 1994); e um domínio carboxi-terminal (C-terminal, C-Ada) que desmetila as bases mutagênicas, como O^6-meG, por transferência irreversível da metila para Cys-321 (SEDGWICK et al., 1988 apud MOORE et al., 1994). Além de Ada, *E. coli* possui uma constitutiva O^6-alcilguanina-DNA alciltransferase (Agt), codificada pelo gene *OGT*, que exibe significante similaridade de sequência com C-Ada (MARGISON et al., 2007). Agt também foi identificada em outros organismos, como em *Saccharomyces cerevisiae* (codificada pelo gene *MGT1*) (SASSANFAR & SAMSON, 1990; XIAO et al., 1991) e *Aspergillus fumigatus* (codificada pelo gene *AfAGT*) (O'HANLON et al., 2012), dentre diversos outros fungos (Figura 6), e inclusive em *Homo sapiens* (DANIELS et al., 2000).

Agt, presente em procariotos e eucariotos, é a principal proteína de reparo de DNA contendo O^6-meG. Essa proteína serve como aceptora do grupo alcila, transferindo o grupo metila na posição O^6 para um resíduo de cisteína (Cys ou C) da própria enzima. Essa reação, chamada suicida, é irreversível e inativa permanentemente a proteína (Figura 5) (LINDAHL et al., 1988; PEGG, 2000; TUBBS & TAINER, 2010), assim como acontece com C-Ada.

O'Hanlon e colaboradores (2012), por meio de pesquisa em bancos de dados genômicos (103 genomas de fungos foram analisados), verificaram que a resposta aos danos de alcilação de DNA mediada por essa proteína é difundida no reino Fungi (Figura 6). Nessa análise, utilizaram AdaB (NCBI e Uniprot: P19220, acessado em 31/03/2018) de *Bacillus subtilis* (linhagem 168) como sequência de consulta contra o banco de dados representativo e, tomando uma proteína de cada vez, as famílias dos genes foram localizadas usando o algoritmo Blastp (*Protein* BLAST) com um valor de expectativa (e-value) de corte de 10^{-10}. No entanto, O'Hanlon e colaboradores (2012) não identificaram um gene putativo que codifique a proteína Agt em *C. neoformans* (Figura 6). Dessa forma, pode ser que a sequência de DNA CNAG_02105 esteja anotada erroneamente nos bancos de dados.

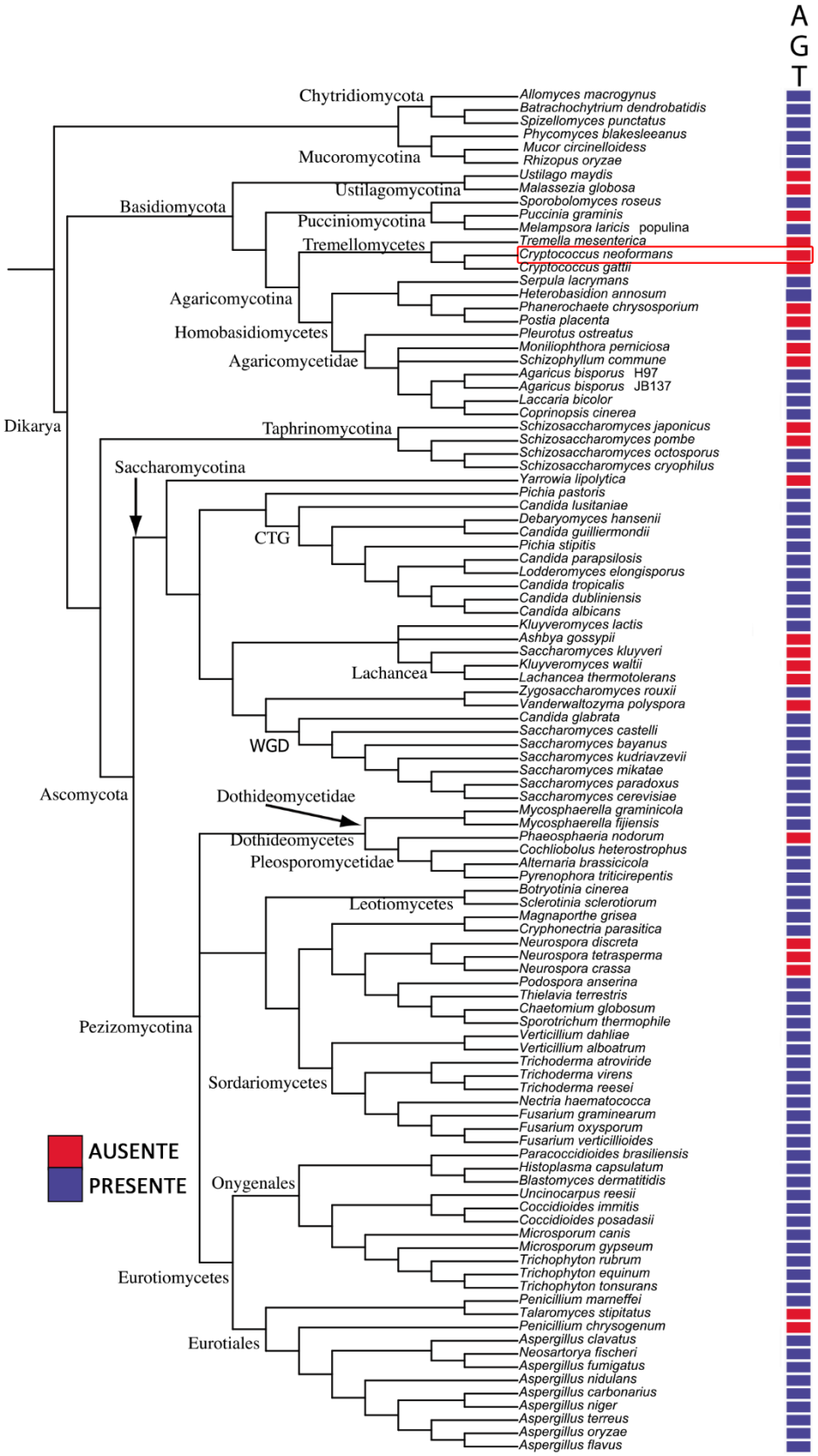


Figura 6: Proteína Agt em diferentes espécies de fungos. Presença (azul) e ausência (vermelho) da proteína Agt (O^6-alcilguanina-DNA alciltransferase) em fungos e sua relação filogenética. O retângulo vermelho evidencia *C. neoformans*. Fonte: adaptado de O'HANLON et al., 2012.

É esperado que, na ausência de proteínas como a Agt no organismo, como acontece com *Schizosaccharomyces pombe* e *Thermus thermophilus*, existam outras proteínas de reparo de DNA, tais como as *Alkyltransferase-like proteins* (Atl) (TUBBS & TAINER, 2010; O'HANLON et al., 2012).

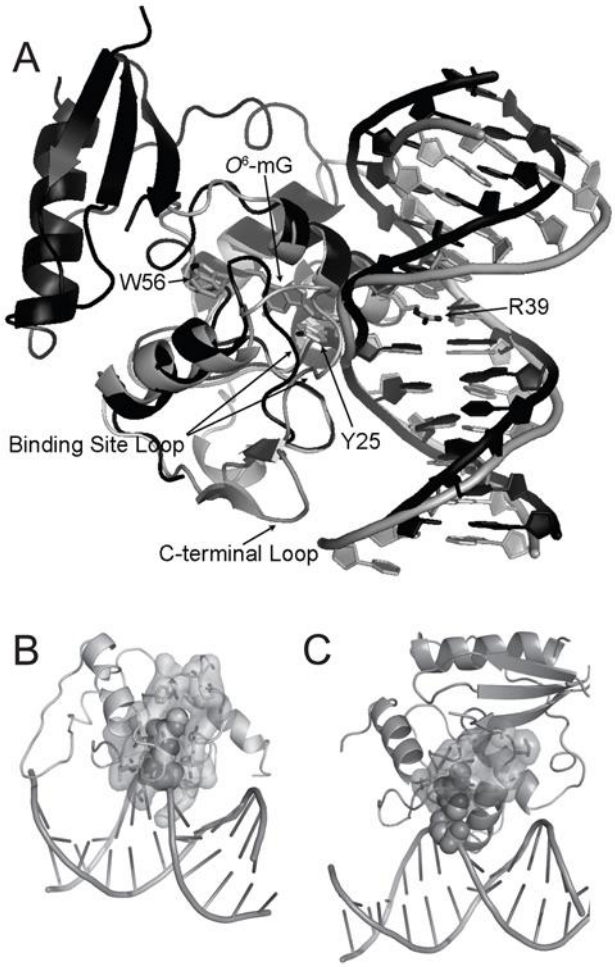


Figura 7: Representação da estrutura das proteínas Atl e Agt ligadas a lesões de DNA. A. Sobreposição estrutural de Atl1 de *S. pombe* (cinza, pdb 3gx4) e Agt humana (hAgt) (preto, pdb lt38) associadas à O^6-meG. Os principais resíduos, loops, e O^6-meG do complexo estrutural estão indicados por setas. **B.** Complexo Atl1-O^6-meG DNA. **C.** Complexo hAgt-O^6-meG DNA. Fonte: adaptado de TUBBS & TAINER, 2010.

1.8 *Alkyltransferase-like protein*

As *Alkyltransferase-like proteins* (Atl) também desempenham um papel de proteção celular contra os efeitos biológicos do dano gerado por alcilação do DNA (TUBBS &

TAINER, 2010). Atl, presentes em bactérias e em alguns fungos, correspondem a uma família homóloga a Agt (Figura 7).

As Atl compartilham motivos funcionais de reparo de DNA com Agt, que possuem a Cys requerida para a atividade de alciltransferase no sítio ativo. Todavia, na maioria das Atl, o resíduo de Cys (C) desse domínio é substituído por outro resíduo, normalmente triptofano (W) (MARGISON et al., 2003; PEARSON et al., 2006). Além disso, as proteínas Atl também não possuem o domínio N-Ada (TUBBS & TAINER, 2010).

As proteínas Atl isoladas, embora possuam grande afinidade de ligação à O^6-meG, não conseguem remover o grupo metila do DNA e reparar a lesão (PEARSON et al., 2006; MARGISON et al., 2007; TUBBS & TAINER, 2010). Todavia, *S. pombe* não possui outra alciltransferase funcional e a deleção de *ATL1* torna esse organismo sensível a uma variedade de agentes alcilantes, o que sugeriu que Atl1 se ligasse a lesões de O^6-meG e as sinalizasse para processamento por outras vias de reparo do DNA (PEARSON et al., 2006; MARGISON et al., 2007). Tubbs e colaboradores (2009) demonstraram que a ligação de Atl1 gera um complexo estável que esculpe o dano da base do DNA alcilada para a entrada na via NER (Figura 5).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Caracterizar fenotipicamente a função do gene CNAG_02105 de *C. neoformans*.

2.2 Objetivos específicos

- Obter linhagem de *C. neoformans* mutante para o gene CNAG_02105;
- Caracterizar a expressão dos principais atributos de virulência e fenótipos da linhagem mutante.

3. JUSTIFICATIVA

CNAG_02105 de *C. neoformans* provavelmente codifica uma proteína associada ao reparo de DNA metilado por agentes alcilantes. Como nenhuma Agt ou Atl, importantes proteínas de reparo de DNA contra alcilação, foi identificada em *C. neoformans* até o presente, o estudo e caracterização desse gene é de enorme importância para compreensão da biologia desse patógeno.

Além disso, como fungos são eucariotos, assim como os hospedeiros mamíferos, alvos para drogas de ação seletiva são muito limitados. Novas classes de drogas antifúngicas não surgem desde o final da década de 1990 (XIE et al., 2014). Seres humanos possuem a proteína Agt (DANIELS et al., 2000), mas não há indícios de que possuam a proteína Atl. Dessa forma, uma provável Atl de *C. neoformans* torna-se relevante por possivelmente representar um alvo para fármacos de ação seletiva sobre o fungo.

4. METODOLOGIA

4.1 Anotação e classificação do gene CNAG_02105

A análise inicial da sequência CNAG_02105 foi realizada por bioinformática. Inicialmente, verificou-se a anotação do gene CNAG_02105 de *C. neoformans* no banco de dados genômicos FungiDB <http://fungidb.org>. Para identificação de sequências similares, foram realizados alinhamentos pelo programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. As análises foram feitas tanto pelo Blastn (*Nucleotide* BLAST) como pelo Blastp; esse último, com a sequência de aminoácidos (aa) predita a partir de CNAG_02105 (FungiDB, Uniprot <http://uniprot.org>, NCBI *Protein* <https://ncbi.nlm.nih.gov/protein>). Diante do resultado desses alinhamentos, foram então selecionadas aquelas proteínas de outros organismos que demostraram maior similaridade com a sequência de interesse, com as quais foi realizado um segundo alinhamento e montagem de dendrograma, utilizando-se o programa Clustal Omega <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>.

Em análise paralela, foram feitos o alinhamento e a montagem de dendrograma usando a sequência da proteína predita de CNAG_02105 e demais proteínas pré-selecionadas com base na literatura acerca de enzimas envolvidas na atividade de reparo da lesão O^6-meG de DNA. Foram elas a proteína Ada de *E. coli* (MCCARTHY & LINDAHL, 1985), Agt de *E. coli* (MARGISON et al., 2007), Atl1 de *E. coli* (PEARSON et al., 2005), Agt de *S. cerevisiae* (SASSANFAR & SAMSON, 1990), Agt de *H. sapiens* (hAgt) (DANIELS et al., 2000) e Atl1 de *S. pombe* (PEARSON et al., 2006). Para essa análise, as proteínas tiveram suas sequências de aa (FASTA) levantadas por meio do banco de dados Uniprot.

4.2 Linhagens e condições de cultura de *C. neoformans*

Nesse estudo, foram utilizadas as linhagens de *C. neoformans* H99 e JF289 (HSUEH et al., 2008), que apresenta três cópias do transgene *SXI2***a**-*URA5* integradas no genoma e resistência à noursetricina (NAT).

Os estoques das diferentes linhagens de *C. neoformans* foram mantidos a -80°C, em 35% de glicerol. As células foram cultivadas a 30, 37 ou 39°C, de acordo com o experimento, especialmente em meio *Yeast extract* - *Peptone* - *Dextrose* (YPD) líquido (1% de extrato de

levedura, 2% de peptona, 2% de glicose, pH 5,6), a 70 rotações por minuto; ou em meio YPD sólido (com adição de 1,8% de ágar).

4.3 Deleção gênica

As linhagens de *C. neoformans* mutantes para o gene putativo *ATL1* (*atl1*Δ) foram geradas a partir da linhagem JF289 (HSUEH et al., 2008). A deleção gênica deu-se pela substituição da região codificadora (ORF – *Open Reading Frame*) desse gene pelo cassete que confere resistência ao antibiótico neomicina (*NEO*), controlado pela sequência promotora do gene de actina e terminadora de trpC, ambas de *C. neoformans*. O plasmídeo pPZP-NEO (WALTON et al., 2005; doado pela Dr. L. Fernandes) foi usado como molde para a amplificação do cassete *NEO* (Figura 8).

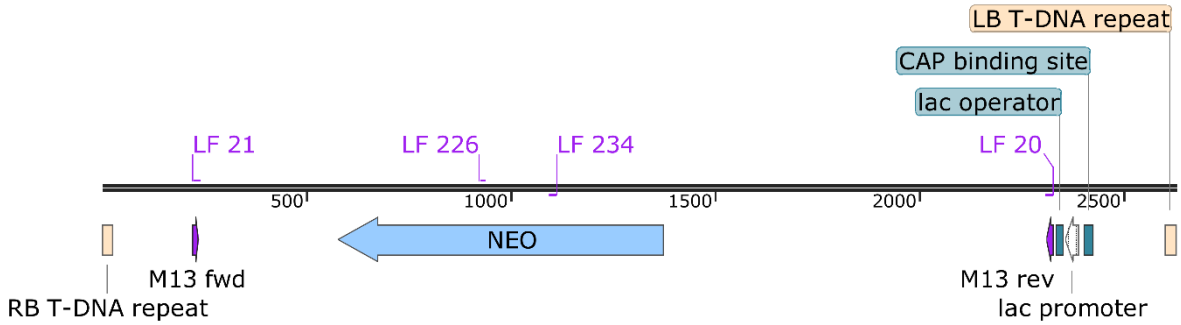


Figura 8: Representação esquemática do cassete *NEO*. Parte do plasmídeo pPZP-NEO que contêm sequência do gene *NEO*, que confere resistência ao antibiótico neomicina. Em roxo estão representados os iniciadores de polimerização utilizados nesse estudo para amplificar o cassete *NEO*. Figura criada no programa SnapGene <http://www.snapgene.com>.

Tabela 1: Iniciadores de polimerização utilizados para geração dos fragmentos dos cassetes de deleção gênica

Iniciador	Sequência	Sequência Alvo	Tamanho Esperado do Produto
LF515 LF516	CACCCTCTCCATAAACTTCG *ATCATGTCATAGCTGTTTCCTG*CTGATCGTCTGTTCTTGCTC	02105 5’	974pb
LF517 LF518	*GCACTGGCCGTCGTTTTAC*GTTGGTGTATGGGAAGGAAC GCTCTAGGCAAGACACTCAA	02105 3’	1154pb
LF20 LF226	CAGGAAACAGCTATGACATGAT GTAAAACGACGGCCAGTGC	NEO 3’	1408pb
LF21 LF234	GTAAAACGACGGCCAGTGC CCGGCTTCCATCCGAGTA	NEO 5’	892pb

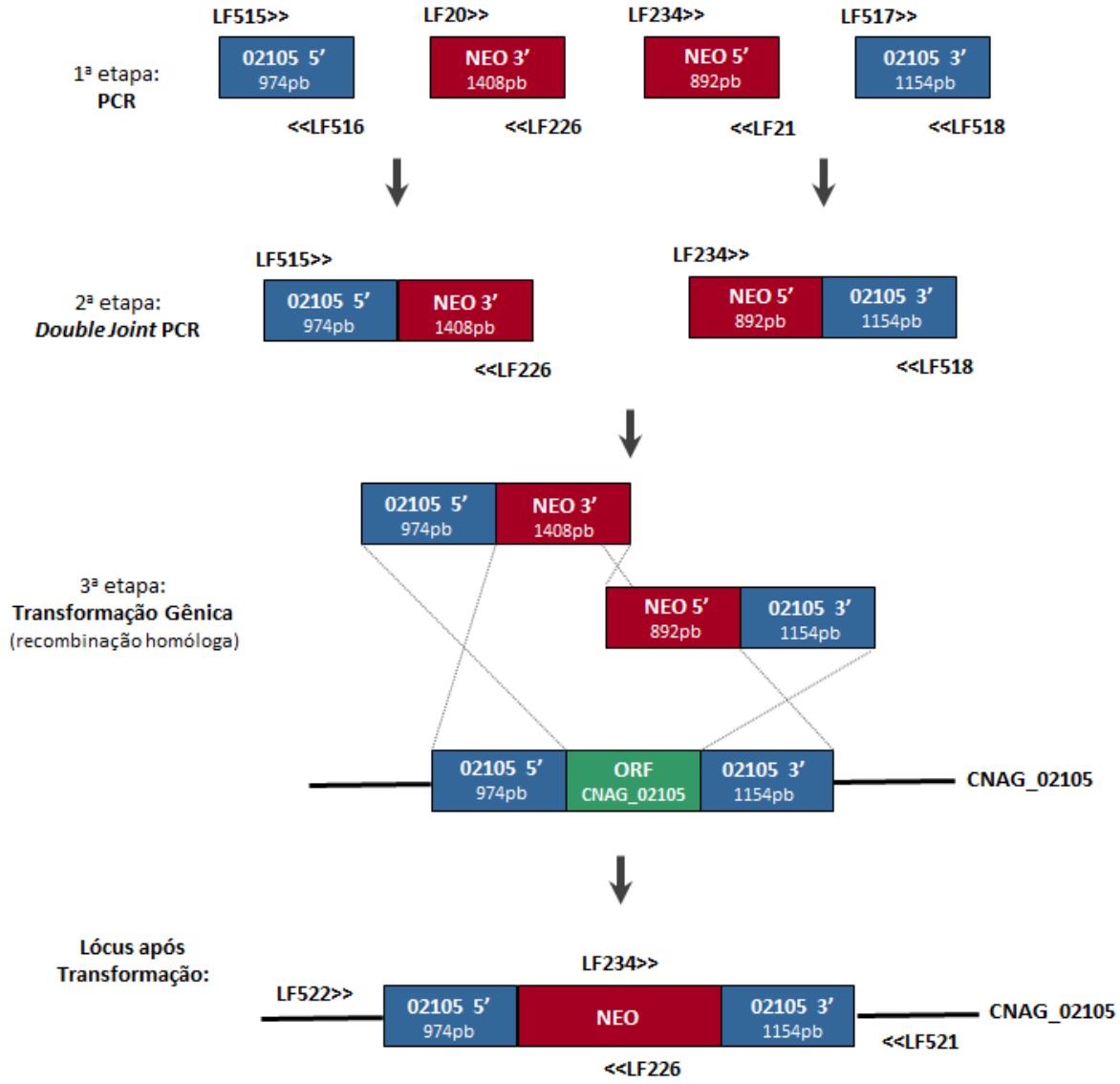


Figura 9: Representação esquemática das etapas de deleção gênica. 1ª Etapa: geração dos fragmentos. 2ª Etapa: *Double-joint* PCR para geração dos cassetes de deleção. 3ª Etapa: transformação gênica, deleção de CNAG_02105, gene putativo *ATL1* de *C. neoformans*, por indução de recombinação homóloga.

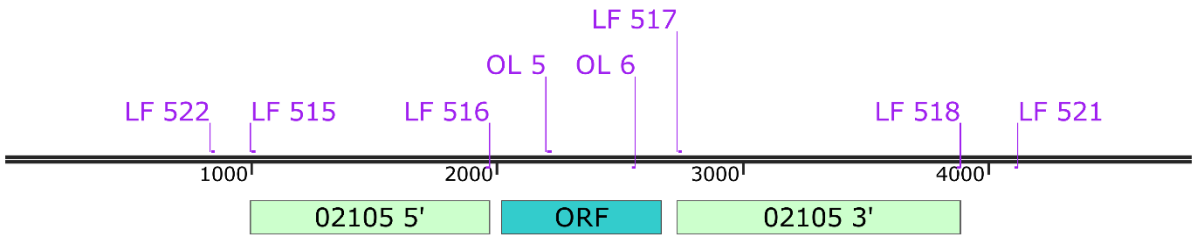


Figura 10: Representação esquemática da sequência de DNA CNAG_02105. A ORF do gene está representada pelo retângulo azul. As regiões flanqueadoras 02105 5' e 02105 3' estão representadas pelos retângulos verdes. Em roxo estão representados os iniciadores de polimerização utilizados nesse estudo para amplificar os fragmentos 02105 5' e 02105 3', como também aqueles utilizados para confirmação do mutante. Figura criada no programa SnapGene <http://www.snapgene.com>.

A técnica *Double-joint* PCR (KIM et al., 2009) foi utilizada para a deleção do gene putativo *ATL1,* por meio de indução de recombinação homóloga. Para tal fim, amplificou-se, por PCR, o cassete *NEO* em duas partes, NEO 5' e NEO 3'; e os fragmentos 02105 5' e 02105 3', utilizando os oligonucleotídeos listados na Tabela 1 (Figura 9). 02105 5' e 02105 3' consistem nas regiões flanqueadoras de CNAG_02105, sequência de DNA do gene putativo *ATL1*, e foram amplificados utilizando-se DNA genômico (gDNA) de JF289 como molde (Figura 10), extraído utilizando-se o protocolo "Smash & Grab" (HOFFMAN & WINSTON, 1987). Essas reações de PCR foram realizadas com a *Taq DNA Recombinant* (*Invitrogen*) seguindo-se as recomendações do fabricante, e os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo 0,5µg/mL.

Com esses quatro fragmentos, construiu-se então os dois fragmentos que compõe o cassete de deleção por *Double-joint* PCR: 02105 5' + NEO 3' (2382pb), com os iniciadores LF515 e LF226; e 02105 3' + NEO 5' (2046pb), com os iniciadores LF234 e LF518 (Figura 9). A *Double-joint* PCR para a construção dos cassetes de deleção é possível devido à presença da cauda no iniciador LF516 (representada em azul e itálico na Tabela 1) que é complementar e reversa à sequência de LF20 (M13Rev) (representada em azul na Tabela 1), e à cauda no iniciador LF517 (representada em verde e itálico na Tabela 1) que é complementar e reversa à sequência de LF21 (M13Fwd) (representada em verde na Tabela 1). Nessa etapa, foi utilizada a enzima *LongAmp Taq DNA Polymerase* (*New England Biolabs*), de acordo com instruções do fabricante, e os produtos de amplificação foram igualmente analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo 0,5µg/mL. O cassete de deleção foi extraído e purificado do gel de agarose utilizando-se o *Agarose Gel Extraction Kit* (*Cellco*), conforme instruções do fabricante.

A transformação genética foi realizada pela técnica de biobalística (cujo protocolo de transformação foi baseado em TOFFALETTI et al., 1993) e a seleção de transformantes foi feita pela capacidade dos isolados de crescerem na presença de neomicina (NEO) (concentração de 200µg/mL).

Foi analisada a estabilidade mitótica dos prováveis mutantes por meio de dez passagens alternando-se ausência e presença dos antibióticos NEO e NAT, na concentração de 200 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. A estabilidade era verificada pela capacidade das colônias continuarem a crescer na condição seletiva (meio com NAT e NEO) após essas sucessivas passagens.

Tabela 2: Iniciadores de polimerização utilizados nas PCRs de confirmação de mutantes *atl1*Δ

	Iniciador	Sequência	Sequência Alvo	Tamanho Esperado do Produto
1.	LF234 LF521	CCGGCTTCCATCCGAGTA GATATGTCTGTCGTCGAAGC	Região Flanqueadora 3' + NEO 5'	Δ: 2280pb
2.	LF522 LF226	AGATGTCTAAGGAGCAGCAG GTAAAACGACGGCCAGTGC	Região Flanqueadora 5' + NEO 3'	Δ: 2547pb
3.	OL5 OL6	TAGGTCAAATCCACAGCATTAG CATCTTCTAGTCGTTCCTTTTG	ORF de CNAG_02105	WT: 363pb
4.	LF522 OL6	AGATGTCTAAGGAGCAGCAG CATCTTCTAGTCGTTCCTTTTG	Região Flanqueadora 5' + ORF	WT: 1732pb
5.	OL5 LF521	TAGGTCAAATCCACAGCATTAG GATATGTCTGTCGTCGAAGC	Região Flanqueadora 3' + ORF	WT: 1918pb
6.	LF522 LF521	AGATGTCTAAGGAGCAGCAG GATATGTCTGTCGTCGAAGC	Região Flanqueadora	WT: 3287pb Δ: 4636pb

Δ: *atl1*Δ; WT: sequência CNAG_02105 selvagem.

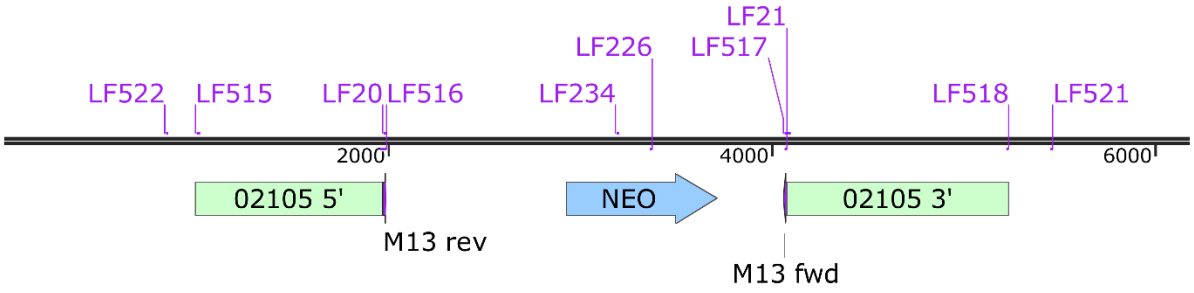


Figura 11: Representação esquemática da sequência de DNA CNAG_02105 após a transformação. Sequência predita para *atl1*Δ, no qual a ORF do gene foi substituída pelo cassete de resistência a *NEO*, representado pela seta verde. As regiões flanqueadoras 02105 5' e 02105 3' estão representadas pelos retângulos verdes. Em roxo estão representados os iniciadores de polimerização utilizados nesse estudo. Figura criada no programa SnapGene <http://www.snapgene.com>.

A inserção do cassete de *NEO* no lócus CNAG_02105 (Figura 11) foi posteriormente confirmada por seis diferentes PCRs (Tabela 2), realizadas com as enzimas *Taq DNA Recombinant* (*Invitrogen*), *OneTaq DNA Polymerase* (*New England Biolabs*) ou *LongAmp Taq DNA Polymerase* (*New England Biolabs*), dependendo do tamanho do fragmento gerado. O gDNA dos isolados transformantes também foi extraído utilizando-se o protocolo "Smash & Grab" (HOFFMAN & WINSTON, 1987) e os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo 0,5µg/mL.

A mesma metodologia de deleção gênica (Figura 9) e confirmação foi utilizada para a obtenção de um segundo mutante independente.

4.4 Genotipagem do idiotipo de acasalamento e detecção do transgene *URA5*

Os mutantes *atl1*Δ foram genotipados quanto ao idiotipo de acasalamento e a presença do transgene *URA5* foi verificada por PCR empregando-se os iniciadores listados na Tabela 3 (*Taq DNA Recombinant, Invitrogen,* ou *LongAmp Taq DNA Polymerase, New England Biolabs,* dependendo do tamanho do fragmento gerado). Os iniciadores de polimerização para o lócus *MAT* foram doados pelo Dr. J. Heitman. Os mutantes corretos devem ser do idiotipo **a** e possuir o transgene *URA5* integrado no genoma.

Tabela 3: Iniciadores de polimerização utilizados nas PCRs de genotipagem do idiotipo de acasalamento e detecção do transgene *URA5*

Iniciador	Sequência	Sequência Alvo	Tamanho Esperado do Produto
JOHE39201 JOHE39202	CTAACTCTACTACACCTCACGGCA CGCACTGCAAAATAGATAAGTCTG	Alelo *MAT***a**	450pb
JOHE39203 JOHE39204	GGCTGCAATCACAGCACCTTAC CTTCATGACATCACTCCCCTAT	Alelo *MAT*α	350pb
WX99 SXURv	CCTGCTTCGTTTAACTCCATGGCAAA TAAAGTTGCCGAAAAGAAGCAC	Transgene *URA5*	~4500pb

4.5 Condições de reações de PCR

4.5.1 Taq DNA Recombinant (Invitrogen)

Configuração da reação (25µL):

Tampão 10x	2,5 µL
dNTP 10Mm	2,0 µL
$MgCl_2$ 50mM	1,0 µL
Primer Fwd 10µM	1,0 µL
Primer Rev 10µM	1,0 µL
Taq DNA Recombinant	0,25 µL
DNA molde (50ng/µL)	1,0 µL
H_2O	até 25 µL

Condição de termociclagem da PCR:

Etapas	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	94ºC	3 min
35 ciclos	94ºC	30 seg
	-	30 seg
	72ºC	1 min por kb
Extensão Final	72ºC	10 min
	4ºC	∞

TA é dependente dos iniciadores de polimerização utilizados na reação; ~5ºC menor que o TM dos iniciadores.

4.5.2 LongAmp Taq DNA Polymerase (New England Biolabs)

Configuração da reação (25µL):

Tampão 5x	5,0 µL
dNTP 10mM	0,75 µL
Primer Fwd 10µM	1,0 µL
Primer Rev 10µM	1,0 µL
LongAmp Taq DNA	1,0 µL
DNA molde (50ng/µL)	1,0 µL
H_2O	até 25 µL

Condição de termociclagem da PCR:

Etapas	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	94ºC	3 min
35 ciclos	94ºC	30 seg
	-	30 seg
	65ºC	1 min por kb
Extensão Final	65ºC	10 min
	4ºC	∞

TA é dependente dos iniciadores de polimerização utilizados na reação; ~5ºC menor que o TM dos iniciadores.

4.5.3 OneTaq DNA Polymerase (New England Biolabs)

Configuração da reação (25µL):

Tampão 5x	5,0 µL
dNTP 10mM	0,5 µL
Primer Fwd 10µM	0,5 µL
Primer Rev 10µM	0,5 µL
LongAmp Taq DNA	0,125 µL
DNA molde (50ng/µL)	1,0 µL
H_2O	até 25 µL

Condição de termociclagem da PCR:

Etapas	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	94ºC	3 min
35 ciclos	94ºC	30 seg
	-	30 seg
	68ºC	1 min por kb
Extensão Final	68ºC	10 min
	4ºC	∞

TA é dependente dos iniciadores de polimerização utilizados na reação; ~5ºC menor que o TM dos iniciadores.

4.6 Avaliação dos fatores de virulência

Para a análise dos fatores de virulência, as linhagens selvagens H99 e JF289 e as linhagens mutantes *atl1*Δ previamente crescidas em meio YPD sólido por 48 horas, a 30°C, foram inoculadas e incubadas em meio YPD líquido a 30ºC e 70 rotações por minuto, por 24 horas. As células foram então contadas em hemocitômetro e a densidade celular foi ajustada para 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3 ou 10^2 células/mL, dependendo do experimento.

4.6.1 Avaliação de termotolerância

Cinco μL de suspensões celulares na concentração de 10^6, 10^5, 10^4, 10^3 e 10^2 células/mL foram semeados em meio YPD sólido e incubadas a 30, 37 e 39ºC. O crescimento celular foi acompanhado visualmente após 24, 48 e 72 horas de incubação e a termotolerância foi avaliada pelo crescimento em cada temperatura, em comparação às linhagens selvagens.

4.6.2 Expansão da cápsula polissacarídica

As células foram semeadas em meio mínimo líquido quimicamente definido (MM: glicose 15mM, $MgSO_4$ 10mM, KH_2PO_4 29,3mM, glicina 13mM, tiamina 3mM, pH 5,5) na concentração de 10^7 células/mL e incubadas a 30 ou 37°C, a 200 rpm, durante 48 horas. Em seguida, 2μL da suspensão celular foram misturados com 2μL de tinta nanquim em lâminas posteriormente observadas ao microscópio óptico invertido *Primovert* a uma ampliação de 40X. Campos diferentes foram escolhidos aleatoriamente e fotografados, utilizando-se *ZEISS Axiocam ERc 5s*, totalizando pelo menos 50 células fotografadas. O experimento foi realizado em triplicata técnica.

O diâmetro da célula total (célula de levedura + cápsula) e o diâmetro do corpo celular (limitado pela parede celular) foram medidos pelo programa gratuito Zen Blue <https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/microscope-software/zen-lite.html>. A espessura da cápsula foi definida como a diferença entre o diâmetro total da célula e o diâmetro do corpo celular. As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism versão 7 para Windows <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>. Na elaboração dos gráficos de dispersão de tamanho da cápsula e do corpo celular, foi considerada a réplica técnica que representava a mediana entre os três testes realizados da mesma linhagem. Para os testes estatísticos, foram consideradas as razões entre as linhagens teste (mutantes *atl1*Δ) e a linhagem controle (JF289), que foram comparadas pelo teste paramétrico *One-way* Anova com pós-teste de Dunnett.

4.6.3 Ensaio de melanização da parede celular

Cinco μL da diluição celular de 10^6 células/mL foram semeados em 1mL de MM líquido ou MM sólido (ágar 2%) suplementado com L-dopa 1mM (Sigma-Aldrich), em placas

de 24 poços. As culturas foram incubadas a 30 ou 37ºC, protegidas da luz, a 200 rpm no caso do meio líquido. A produção de melanina foi acompanhada a cada 24 horas: quanto mais escura a colônia ou suspensão celular, maior o acúmulo do pigmento. Os ensaios foram realizados em triplicata técnica.

4.6.4 Avaliação da produção de urease

A reação catalisada pela urease resulta em aumento de pH. A capacidade das diferentes linhagens de produzir e secretar urease ativa foi avaliada em meio de *Christiansen* sólido (peptona 0,01%, NaCl 0,05%, KH_2PO_4 0,02%, vermelho de fenol 0,0016%, dextrose urea 2%, ágar 2%, pH 6,9), no qual é verificada mudança de coloração (de amarelo para rosado) à medida que seu pH torna-se mais básico. As leveduras tiveram a concentração celular ajustada para 10^7 células/mL e 5µL da suspensão celular foram semeados por poço em placa de 6 poços contendo 3mL do meio. As placas foram incubadas a 30 ou 37ºC e a mudança na coloração do meio foi monitorada a cada 12 horas. O ensaio foi realizado em triplicata técnica.

4.7 Avaliação da virulência no modelo de larvas de *Galleria mellonela*

Lagartas de *G. mellonela* são modelo de infecção para *C. neoformans* (MYLONAKISNO et al., 2005). Nesse experimento, foram empregadas 14 lagartas no estágio larval do instar final (doadas pela Dr. P. Albuquerque) escolhidas aleatoriamente para cada linhagem de *C. neoformans* testada: JF289 e *atl1*Δ 21. 10µL de uma suspensão de 5 x 10^6 células/mL foram injetados na hemocele de cada lagarta, utilizando-se uma seringa Hamilton de 10mL. PBS (tampão fosfato-salino) foi utilizado como controle negativo da infecção. Para prevenir a contaminação bacteriana, 20mg de ampicilina/kg de peso corporal foram coadministrados. As lagartas foram colocadas em uma placa de Petri e incubadas a 37ºC. A sobrevivência das larvas foi visualmente monitorada uma vez por dia. O gráfico foi obtido pelo programa GraphPad Prism versão 7 para Windows. Para os testes estatísticos, as condições foram comparadas pelo teste paramétrico *Log-rank* (*Mantel-Cox*).

4.8 Avaliação da formação de hifas de acasalamento e do desenvolvimento do ciclo sexual

As linhagens de idiotipos de acasalamento opostos (**a** e α) foram cultivadas em meio YPD sólido a 30ºC. As leveduras foram colhidas da placa de cultura e ressuspendidas em tubo Eppendorf contendo 500µL de água milliQ estéril (isoladamente, como controle negativo, ou em conjunto para o cruzamento). Em seguida, 20µL da suspensão celular foram semeados em meio filamentação ágar (FA: 6,7g/L de YNB sem aa e sem sulfato de amônio; glicose 0,5%; ágar 4%; pH 5) ou meio Murashige & Skoog (MS: 4,328g de MS *Basal Salt Mixture*, *Sigma-Aldrich*; ágar 1,6%; 1mL de MS *Vitamin Solution*, *Sigma-Aldrich*; pH 5,8). As placas foram armazenadas à temperatura ambiente, no escuro. Após duas semanas, a formação de hifas, basidiosporos e cadeias de esporos foi analisada por microscopia óptica. Esse ensaio foi realizado em triplicata biológica.

4.9 Teste de sensibilidade a condições estressoras e a agentes alcilantes

Tabela 4: Condições estressoras

Condições Estressoras	Concentração / Dose	Mecanismo de Ação
KCl (Cloreto de Potássio)	1,5 e 2,0 M	Estresse osmótico
NaCl (Cloreto de Sódio)	1,5 e 2,0 M	Estresse osmótico
D-Sorbitol	2,5 M	Estresse osmótico
Vermelho do Congo	0,5% e 1,0%	Estresse de parede celular
SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)	0,01% e 0,1%	Estresse de parede celular
H_2O_2 (Peróxido de Hidrogênio)	5 mM	Estresse oxidativo
Menadiona	3 µg/mL	Estresse oxidativo, geração de superóxido
Hidroxiurea	50 mM	Danos ao DNA (genotóxico); diminuição da produção de desoxirribonucleotídeos
Fluconazol	18 µg/mL	Ação antimicótica; impede a síntese de ergosterol, principal esterol da membrana plasmática da maioria dos fungos
pH Ácido	pH 4	
pH Básico	pH 8	
Radiação UV	80, 240, 480 e 960 J/m^2	Danos ao DNA

As linhagens selvagens H99 e JF289 e as linhagens mutantes para *ATL1* previamente crescidas em meio YPD sólido (pH 5,6) por 48 horas, a 30°C, foram inoculadas e incubadas

em meio YPD líquido (pH 5,6) a 30ºC e 70 rotações por minuto, por 24 horas. As células foram então contadas em hemocitômetro e a densidade celular foi ajustada para 10^6, 10^5, 10^4, 10^3 e 10^2 células/mL. Cinco µL de cada suspensão celular foram posteriormente semeados em meio YPD sólido contendo diferentes agentes estressores (Tabela 4) ou agentes alcilantes (*Sigma-Aldrich*) (Tabela 5) e incubadas a 30 ou 37ºC. O crescimento celular foi acompanhado visualmente a cada 24 horas de incubação.

Os agentes estressores KCl, NaCl, D-sorbitol (sorbitol) e vermelho do Congo foram adicionados durante a preparação do meio e autoclavados juntamente. SDS, H_2O_2, menadiona e hidroxiurea (HU) foram esterilizados por filtração em membrana de 0,45 µM e adicionados posteriormente à autoclavagem e resfriamento do meio, a uma temperatura em torno de 50ºC. Fluconazol e os agentes alcilantes também foram adicionados após a preparação e resfriamento do meio.

Tabela 5: Agentes alcilantes

Agente Alcilante	Concentração	Mecanismo de Ação
Metil metanossulfonato (MMS)	0,03% a 0,06%	Indução de mutação por erro de pareamento de base ou bloqueio de replicação.
Etil metanossulfonato (EMS)	0,2 e 0,3%	Indução de mutações randômicas por substituição de nucleotídeos, particularmente devido à alcilação de guanina.
Etil nitrosourea (ENU)	100 µg/mL	Indução de mutações randômicas de pares de base simples; causa erro de pareamento e substituição de base.

Para avaliar a resistência das linhagens a diferentes pHs, o meio YPD foi acrescido de 5% de ágar, uma vez que concentração maior de ágar é requerida para a solidificação nessas condições. O pH do meio foi ajustado com ou sem a adição de tampão. Foi utilizado o tampão Tris(hidroximetil)aminometano - ácido clorídrico (Tris-HCl) para pH 8; e os tampões Acetato (acetato de sódio e ácido acético) e Citrato (citrato de sódio e ácido cítrico) para pH 4. A soluções estoques dos tampões foram preparadas a concentração de 1M (Anexo IV), esterilizadas por filtração em membrana de 0,45 µM e diluídos para uma concentração final de 100mM em YPD sólido (WASKO et al., 2013). O pH foi confirmado antes e depois da diluição no meio de cultura, por medição em pHmetro. Para o ajuste de pH sem a adição de tampão, HCl ou NaOH (hidróxido de sódio) foram adicionados até atingir o pH desejado, previamente à autoclavagem do meio (WASKO et al., 2013).

Tampão Tris-HCl 1 M - pH 8 (10 ml)

1,2 g de Tris

Ajustar pH para 8 com HCl

Completar para 10 ml com água destilada (dH_2O)

Tampão Acetato 1 M - pH 4 (10 ml)

0,147 g de acetato de sódio

0,47 ml de ácido acético

Completar para 10 ml com dH_2O

pH estará igual a 4, ao final

Tampão Citrato 1 M - pH 4 (15 ml)

1,785 g de ácido cítrico

1,65 g de citrato de sódio

Completar para 15 ml com dH_2O

pH estará igual a 4, ao final

Para se avaliar a capacidade de sobrevivência das linhagens à radiação UV, as células foram expostas a diferentes doses de radiação (Tabela 4) no equipamento *CL-1000 Ultraviolet Crosslinker UVP* (*Richmond Scientific*) e incubadas a 30 ou 37ºC protegidas da luz.

A resistência ou sensibilidade às condições estressoras ou aos agentes alcilantes foi avaliada visualmente pelo crescimento em comparação às linhagens selvagens. Todos os ensaios foram realizados em triplicata técnica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 A CNAG_02105 codifica Atl1 putativa em *C. neoformans*

CNAG_02105 está anotada como sequência codificadora de provável Agt em *C. neoformans* (FungiDB e UniProt, acessados em 31/03/2018). Essa sequência de DNA possui quatro éxons e gera duas variantes de transcritos (FungiDB): a primeira com 538 nt, gerando proteína de 120 aa (Uniprot: J9VSW9; NCBI: XP_012049949.1); e a segunda com 487 nt, gerando proteína de 103 aa (Uniprot: T2BMM2). Para as análises realizadas nesse estudo, utilizou-se a sequência da maior variante.

Ao realizar alinhamento da CNAG_02105 pelo programa Blastn, verificou-se similaridade apenas com as sequências codificadoras das proteínas Agt de outros organismos, especialmente com as preditas Agt de *Kwoniella mangroviensis* (e-value = 2e-45) e de *Kwoniella dejecticola* (e-value = 2e-43). No entanto, ao realizar alinhamento da proteína predita da CNAG_02105 usando o Blastp, foi verificada, além da similaridade de sequência com Agt, alta similaridade com a Atl1 de *S. pombe* e de outros organismos. Do resultado do Blastp, foram então selecionadas três proteínas Agt e três Atl1 que apresentaram maior similaridade de sequência: as preditas Agt de *Kwoniella heveanensis*, de *K. dejecticola* e de *K. mangroviensis*; e Atl1 de *S. pombe*, de *Armallaria ostoyae* e *Hypsizygus marmoreus* (Tabela 6), com as quais foi realizado alinhamento pelo Clustal Omega (Figura 12).

Tabela 6: Proteínas Agt e Atl1 que demonstraram maior similaridade com a predita proteína codificada por CNAG_02105 em análise no Blastp

Proteína	Cobertura	E-value	Identidade
Agt predita de *K. heveanensis*	95%	8e-65	82%
Agt predita de *K. dejecticola*	96%	1e-64	82%
Agt predita de *K. mangroviensis*	96%	4e-64	80%
Atl1 de *S. pombe*	91%	2e-32	56%
Atl1 de *A. ostoyae*	95%	9e-32	54%
Atl1 de *H. marmoreus*	90%	2e-31	56%

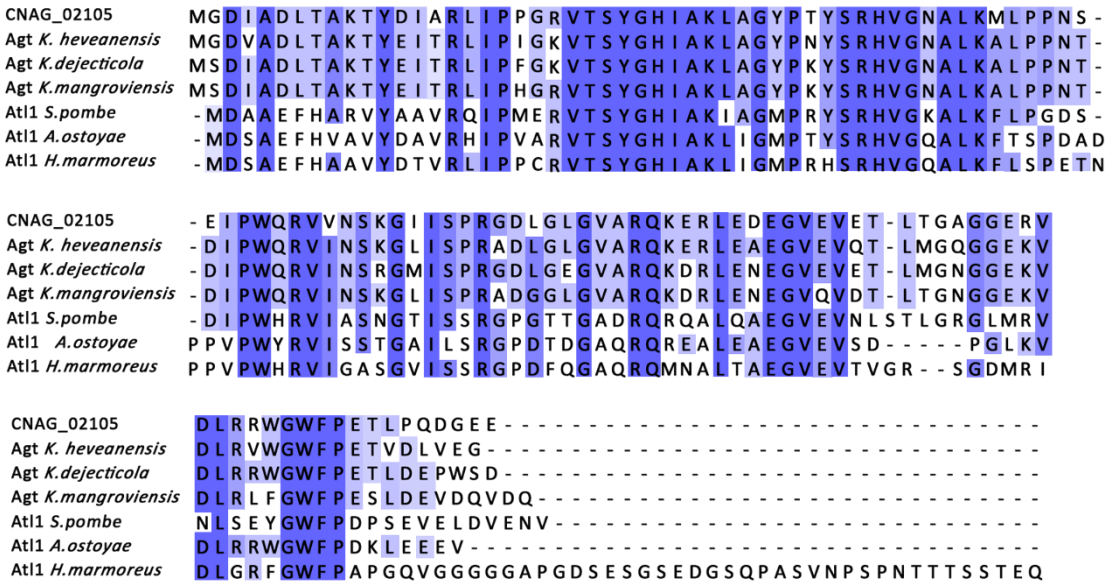


Figura 12: Alinhamento da proteína predita a partir da sequência de CNAG_02105 com as proteínas Agt e Atl1 que apresentaram maior similaridade de sequência em análise realizada pelo Blastp. aa destacados de acordo com a conservação entre as sequências analisadas: mais escuro, mais conservado. O asterisco sinaliza posição onde se esperaria encontrar a Cys do sítio ativo de Agt. Dado gerado pelo programa Clustal Omega <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>.

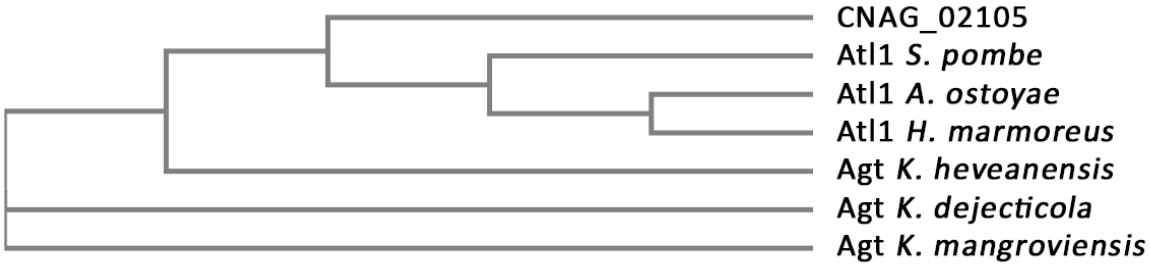


Figura 13: Dendrograma da proteína predita a partir da sequência de CNAG_02105 e das proteínas Agt e Atl1 que apresentaram maior similaridade de sequência em análise realizada pelo Blastp. Análise computacional Neighbour-joining. Dado gerado pelo programa Clustal Omega <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>.

Embora a proteína codificada por CNAG_02105 tenha apresentado maiores porcentagens de cobertura e identidade, e menores valores de e-value com as preditas Agt de outros organismos (Tabela 6), verificou-se que a essa proteína está mais próxima de proteínas Atl1 do que de Agt (Figura 13).

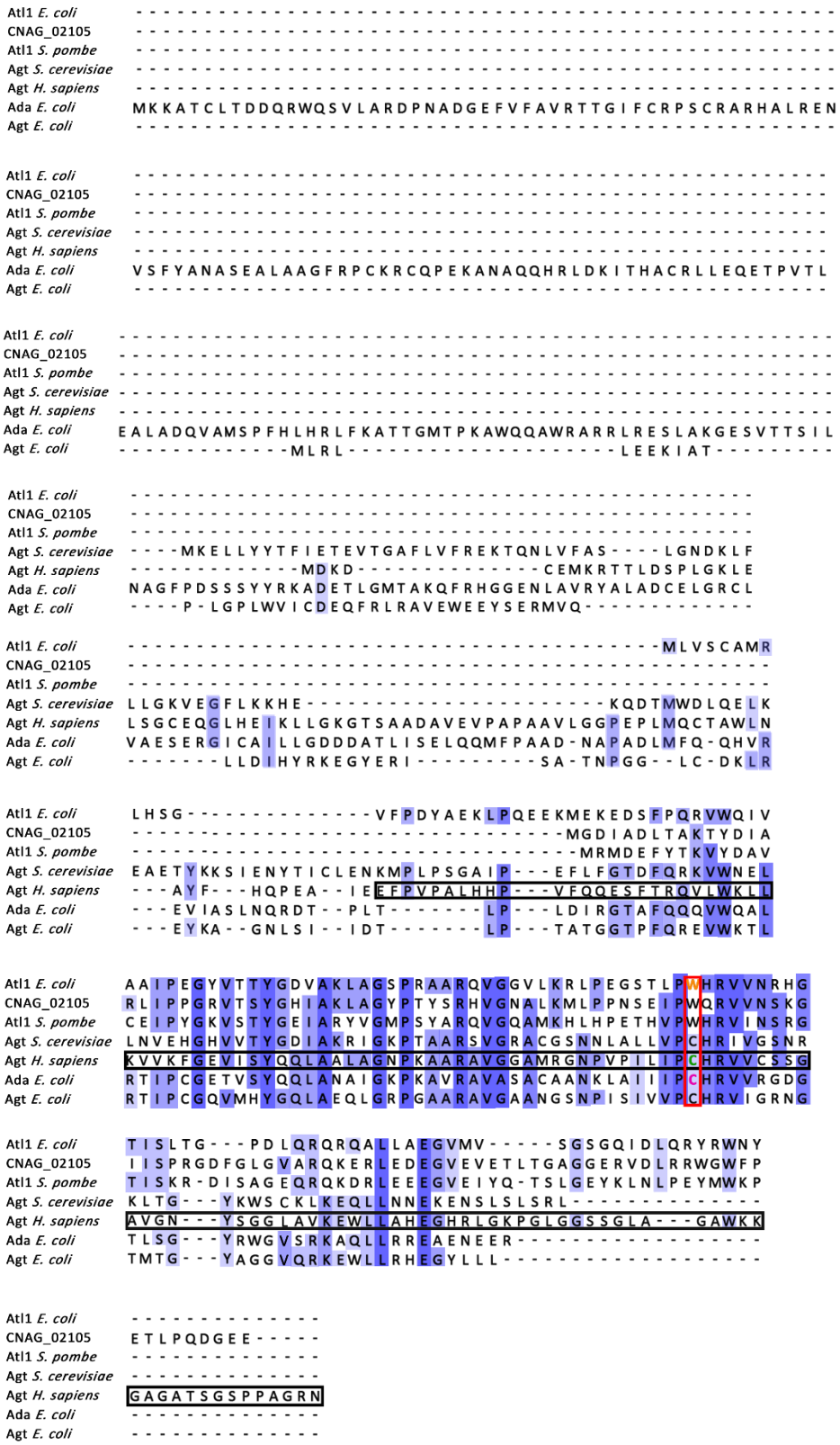


Figura 14: Alinhamento da proteína predita a partir da sequência de CNAG_02105 com as proteínas Ada, Agt e Atl1 de *E. coli*; Agt de *S. cerevisiae*; Agt de *H. sapiens* (hAgt) e Atl1 de *S. pombe*. aa destacados de acordo com a conservação entre as sequências analisadas: mais escuro, mais conservado. Retângulo preto: sítio ativo de hAgt; C cor-de-rosa: resíduo Cys-321 de Ada; C verde: Cys-145 de hAgt; W alaranjado: W-83 de Atl1 de *E.coli*; retângulo vermelho: posição onde foi verificada presença de C nas Agt e W nas Atl1. Dado gerado pelo programa Clustal Omega <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>.

Em alinhamento usando a sequência da proteína predita de CNAG_02105 e as proteínas relacionadas ao reparo de O^6-meG mais descritas na literatura, observou-se que a proteína de CNAG_02105 apresenta maior similaridade com proteínas Atl1 quando comparado às proteínas Ada ou Agt (Figura 14). Na proteína Ada, o aceptor do grupo metila de bases modificadas, como a O^6-meG, é o resíduo Cys-321 (C cor-de-rosa da Figura 14) (SEDGWICK et al., 1988 apud MOORE et al., 1994); enquanto na hAgt, é a Cys-145 (DANIELS et al., 2000) (C verde da Figura 14). Em Atl1, tal resíduo de Cys é substituído por W (MARGISON et al., 2003; PEARSON et al., 2006): na Atl1 de *E.coli*, por exemplo, o W-83 (indicado pelo W alaranjado na Figura 14) é o resíduo que substitui essa Cys (PEARSON et al., 2005). Nesse alinhamento, verificou-se que todas as Agt analisadas possuem, em seu sítio ativo (determinado pelo sítio ativo da hAgt, DANIELS et al., 2000; retângulo preto da Figura 14), resíduo de Cys na mesma posição (retângulo vermelho da Figura 14), que coincidem com as posições da Cys do sítio ativo das alciltransferases previamente descritas na literatura (SEDGWICK et al., 1988 apud MOORE et al., 1994; DANIELS et al., 2000). Nessa mesma posição, as Atl1 analisadas possuem um W, também coincidindo com posição previamente descrita (PEARSON et al., 2005). Foi observado que na proteína predita da CNAG_02105, o aminoácido presente é W, indicando conservação do resísuo presente nas Atl1. Ressalta-se que a proteína predita CNAG_02105 não apresenta nenhum resíduo de Cys na sua sequência.

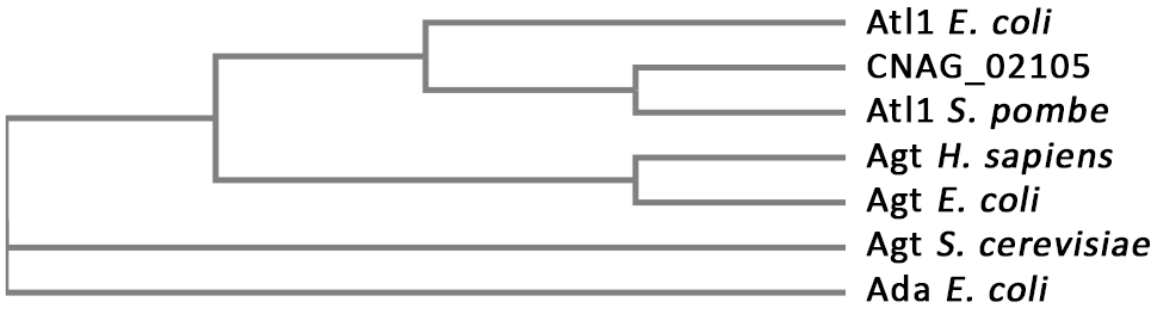


Figura 15: Dendrograma da proteína predita a partir da sequência de CNAG_02105 e das proteínas Ada, Agt e Atl1 de *E. coli*; Agt de *S. cerevisiae*; Agt de *H. sapiens* (hAgt) e Atl1 de *S. pombe*. Dado gerado pelo programa Clustal Omega <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>.

A análise da filogenia das sequências supracitadas corrobora o resultado obtido pela análise dos sítios catalíticos e demonstram que a proteína de CNAG_02105 está mais próxima de Atl1 que de Agt (Figura 15).

Até o momento, a proteína Agt não foi identificada em *C. neoformans* (Figura 6). Os resultados de bioinformática do presente trabalho sugerem que a CNAG_02105 codifica uma proteína Atl1 nesse fungo. Diante da carência de informações acerca das enzimas de reparo de DNA de *C. neoformans* e baseado nos resultados obtidos por análises bioinformáticas, este estudo focou na caracterização funcional do gene CNAG_02105, provável *ATL1* de *C. neoformans*.

A presença de W nas preditas Agt de *K. heveanensis*, *K. dejecticola* e *K. mangroviensis* justamente na posição onde ocorre substituição de C por W em Atl1 de *S. pombe* (W-56) (asterisco da Figura 12) sugere que essas correspondam também a uma Atl1, o que justificaria as altas porcentagens de cobertura e identidade, e o baixo valor de e-value que apresentam em relação à proteína de CNAG_02105 (Tabela 6).

5.2 Linhagens mutantes *atl1*Δ

Após a construção dos cassetes de deleção (Figura 16) e transformação genética por biobalística, a seleção dos prováveis mutantes para o putativo gene *ATL1* foi feita em meio seletivo contendo NAT e NEO (Figura 17). Após análise da estabilidade mitótica dos prováveis mutantes, foram realizadas PCRs de confirmação da deleção (Tabela 2; Figura 18). Constatou-se que seis colônias obtidas do primeiro experimento de transformação genética (isolados 4, 5, 14, 16, 17 e 21) (Figura 19) e que sete derivadas do segundo experimento independente (isolados 28, 31, 34, 35, 38, 41 e 42) (Figura 20) apresentavam de fato a sequência do gene putativo *ATL1* (CNAG_02105) deletada.

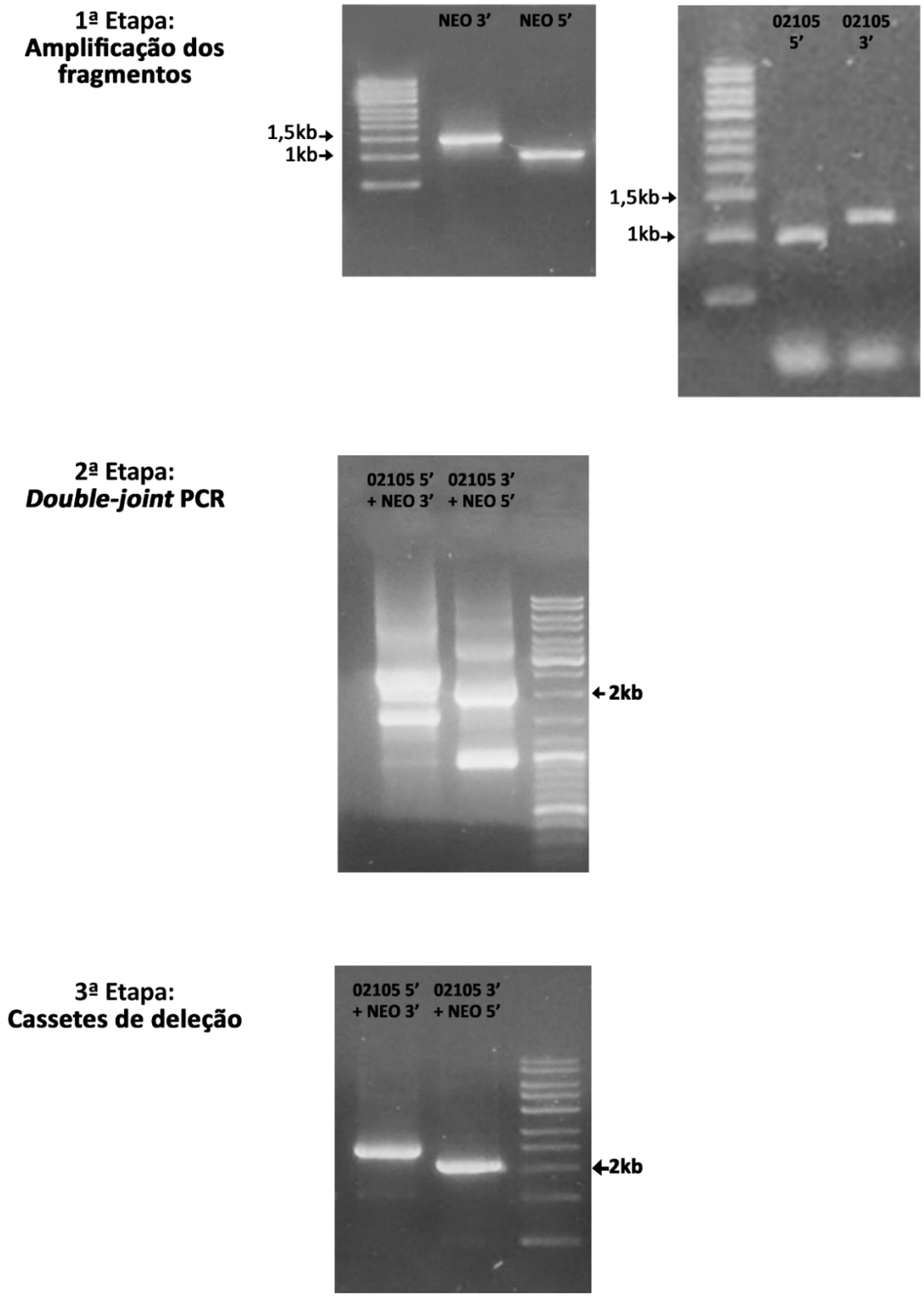


Figura 16: Análise eletroforética de produtos das PCRs de construção dos cassetes de deleção. 1ª Etapa: amplificação dos fragmentos NEO 5' (892pb), NEO 3' (1408pb), 02105 5' (974pb) e 02105 3' (1154pb). 2ª Etapa: *Double-joint* PCR para construção dos cassetes de deleção 02105 5' + NEO 3' (2382pb) e 02105 3' + NEO 5' (2046pb). 3ª Etapa: Cassetes de deleção após eluição de gel de agarose, prontos para serem utilizados na transformação gênica.

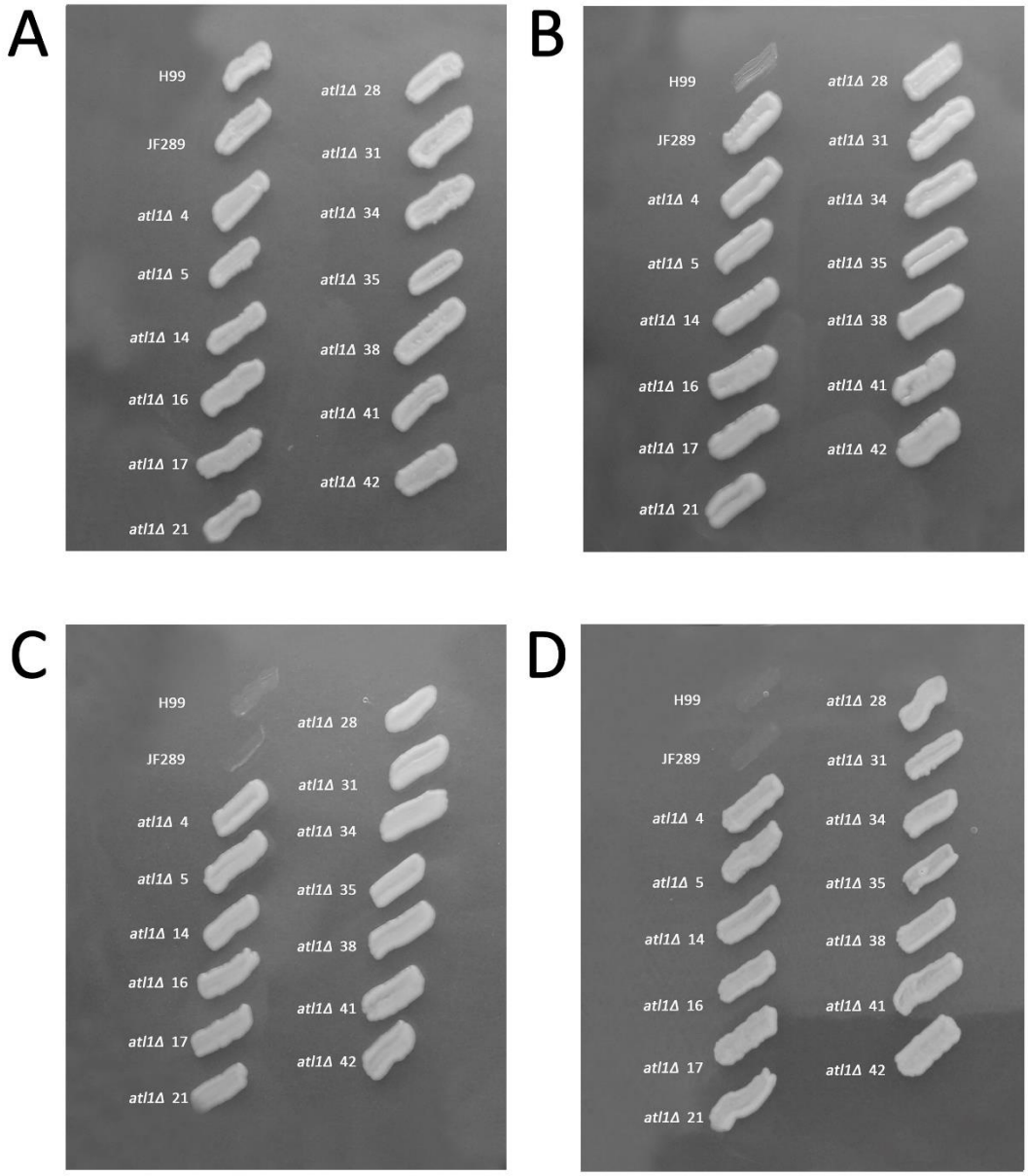


Figura 17: Fotografia de placas de Petri contendo meio seletivo. Crescimento das linhagens controle H99 e JF289, e dos mutantes *atl1*Δ em **A.** meio YPD sem antibióticos, **B.** contendo NAT (100 µg/mL), **C.** contendo NEO (200 µg/mL), e **D.** contendo NAT e NEO.

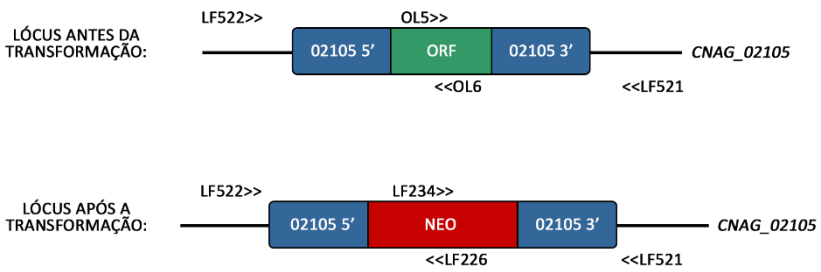


Figura 18: Esquema representativo do lócus CNAG_02105 antes e após a transformação genética. Os iniciadores de polimerização utilizados nas PCRs de confirmação do mutante *atl1*Δ e seus locais de ligação estão indicados.

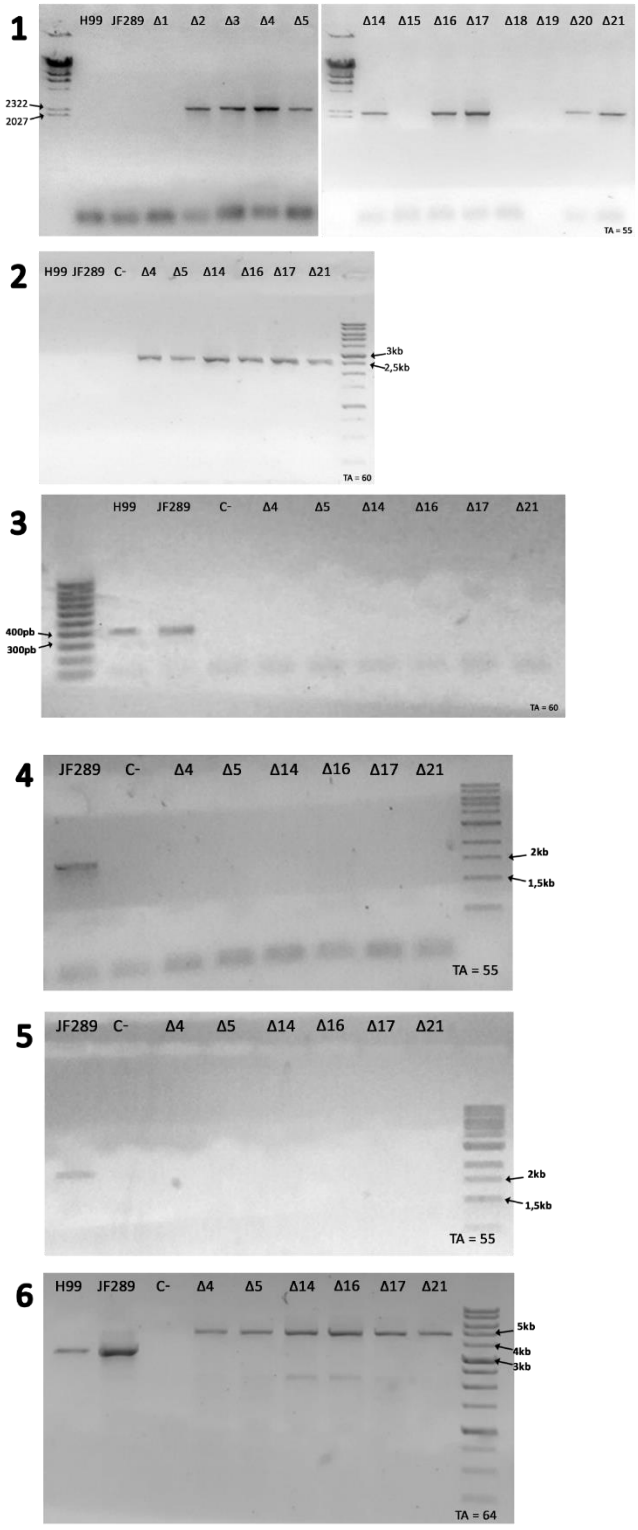


Figura 19: Análise eletroforética de produtos das PCRs de confirmação do primeiro experimento de deleção do gene putativo *ATL1*. DNA das linhagens H99 e JF289 (WT) foi utilizado como controle positivo. Controle negativo (C-): reação de PCR sem DNA molde. TA: temperatura de anelamento dos iniciadores utilizada na reação de PCR (Tabela 2). **1.** Iniciadores LF234 e LF521 (2280pb apenas nos isolados Δ). **2.** Iniciadores LF522 e LF226 (2547pb apenas nos isolados Δ). **3.** Iniciadores OL5 e OL6 (363pb apenas nos isolados WT). **4.** Iniciadores LF522 e OL6 (1732pb apenas nas linhagens WT). **5.** Iniciadores OL5 e LF521 (1918pb apenas nas linhagens WT). **6.** Iniciadores LF522 e LF521 (3287pb nas linhagens WT; 4636pb nos isolados Δ).

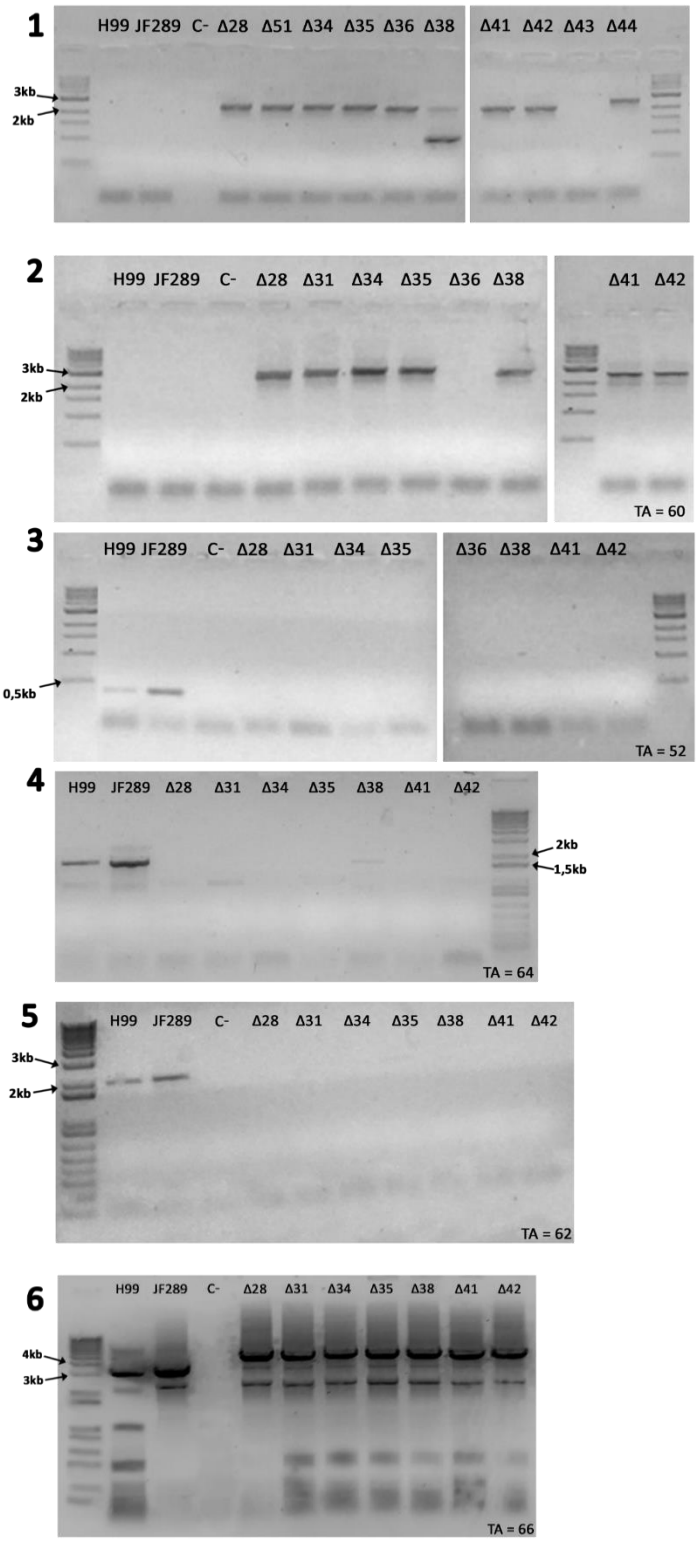


Figura 20: Análise eletroforética de produtos das PCRs de confirmação do segundo experimento de deleção do gene putativo *ATL1*. DNA das linhagens H99 e JF289 (WT) foi utilizado como controle positivo. Controle negativo (C-): reação de PCR sem DNA molde. TA: temperatura de anelamento dos iniciadores utilizada na reação de PCR (Tabela 2). **1.** Iniciadores LF234 e LF521 (2280pb apenas nos isolados Δ). **2.** Iniciadores LF522 e LF226 (2547pb apenas nos isolados Δ). **3.** Iniciadores OL5 e OL6 (363pb apenas nos isolados WT). **4.** Iniciadores LF522 e OL6 (1732pb apenas nas linhagens WT). **5.** Iniciadores OL5 e LF521 (1918pb apenas nas linhagens WT). **6.** Iniciadores LF522 e LF521 (3287pb nas linhagens WT; 4636pb nos isolados Δ).

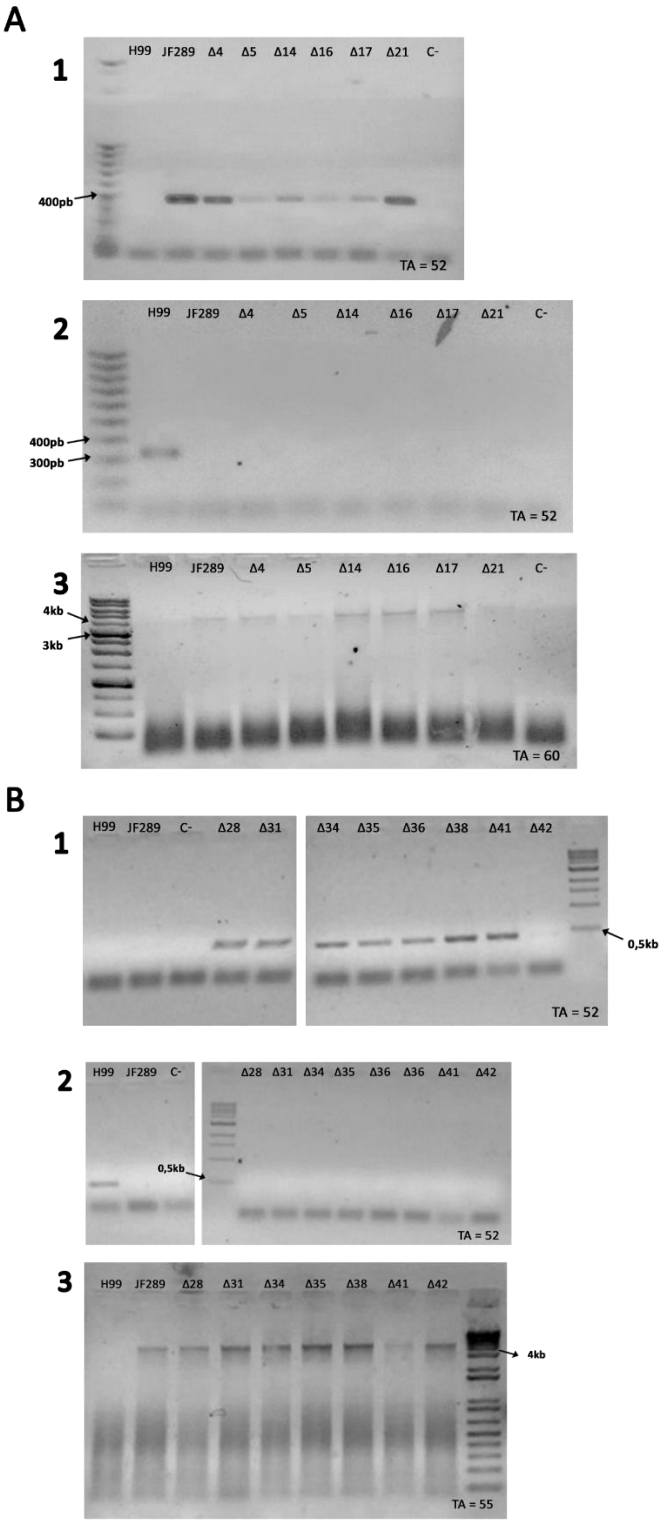


Figura 21: Análise eletroforética de produtos das PCRs de genotipagem do idiotipo de acasalamento e de detecção do transgene *URA5* nos isolados mutantes *atl1*Δ. A. Isolados mutantes obtidos do primeiro experimento de deleção. **B.** Isolados mutantes obtidos do segundo experimento de deleção. Controle negativo (C-): reação de PCR sem DNA molde. TA: temperatura de anelamento dos iniciadores utilizada na reação de PCR (Tabela 3). **1.** PCR para o alelo *MAT***a** com os iniciadores JOHE39201 e JOHE39202 (450pb); linhagem JF289 (*MAT***a**): controle positivo. **2.** PCR para o alelo *MAT*α com os iniciadores JOHE39203 e JOHE39204 (350pb); linhagem H99 (*MAT*α): controle positivo. **3.** PCR para o transgene *URA5* com os iniciadores WX99 e SXURv (~4500pb); linhagem JF289: controle positivo.

Verificou-se, por PCR, que tanto os isolados do primeiro como do segundo experimento de transformação independente para a deleção do putativo *ATL1* são do idiotipo **a** de acasalamento e que possuem o transgene *URA5* integrado no genoma, assim como a linhagem parental JF289 (Figura 21).

5.3 *ATL1* não é requerido para a expressão dos fatores de virulência em *C. neoformans in vitro*

Os mutantes *atl1*Δ não apresentam diferenças na capacidade de crescimento a 37 e 39ºC (Figura 22). Diferentes linhagens mutantes de *C. neoformans* apresentando defeitos de crescimento a 37ºC foram descritas como hipovirulentas, como, por exemplo, mutante para calcineurina (ODOM et al., 1997) e mutantes para os genes de histona desacetilase *HDA1* e *HOS2* (BRANDÃO et al., 2018).

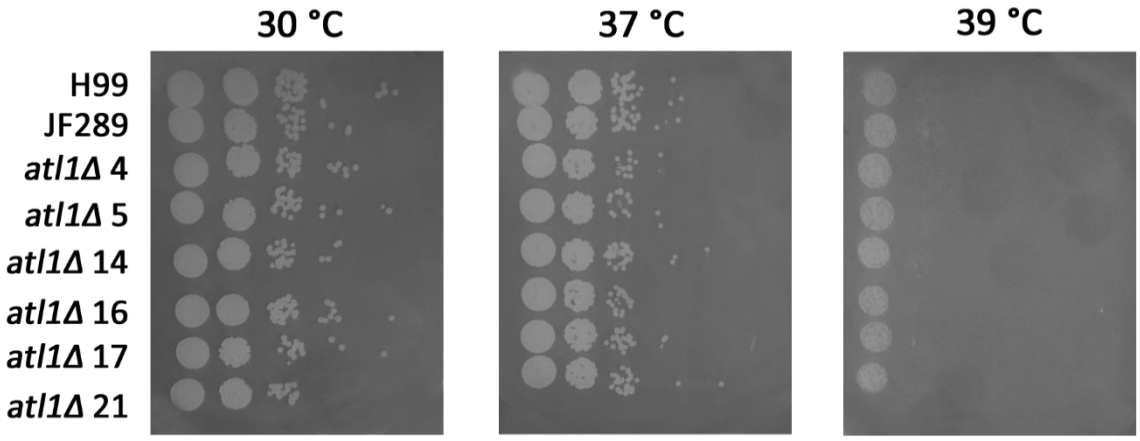


Figura 22: Crescimento das linhagens *atl1*Δ a 30, 37 e 39ºC. H99 e JF289: linhagens controle.

A expansão da cápsula polissacarídica, fator de virulência característico de *C. neoformans*, também foi analisada. Observou-se que as linhagens mutantes, além de apresentarem morfologia normal, são capazes de produzir cápsula como as linhagens controle H99 e JF289 (Figura 23A). O tamanho da cápsula é fator importante no curso da infecção por *C. neoformans*: macrófagos fagocitam preferencialmente leveduras com menor cápsula polissacarídica (BOJARCZUK et al., 2016). Verificou-se que as linhagens *atl1*Δ não apresentam diferença no tamanho da cápsula em relação ao controle JF289 (Figura 23D).

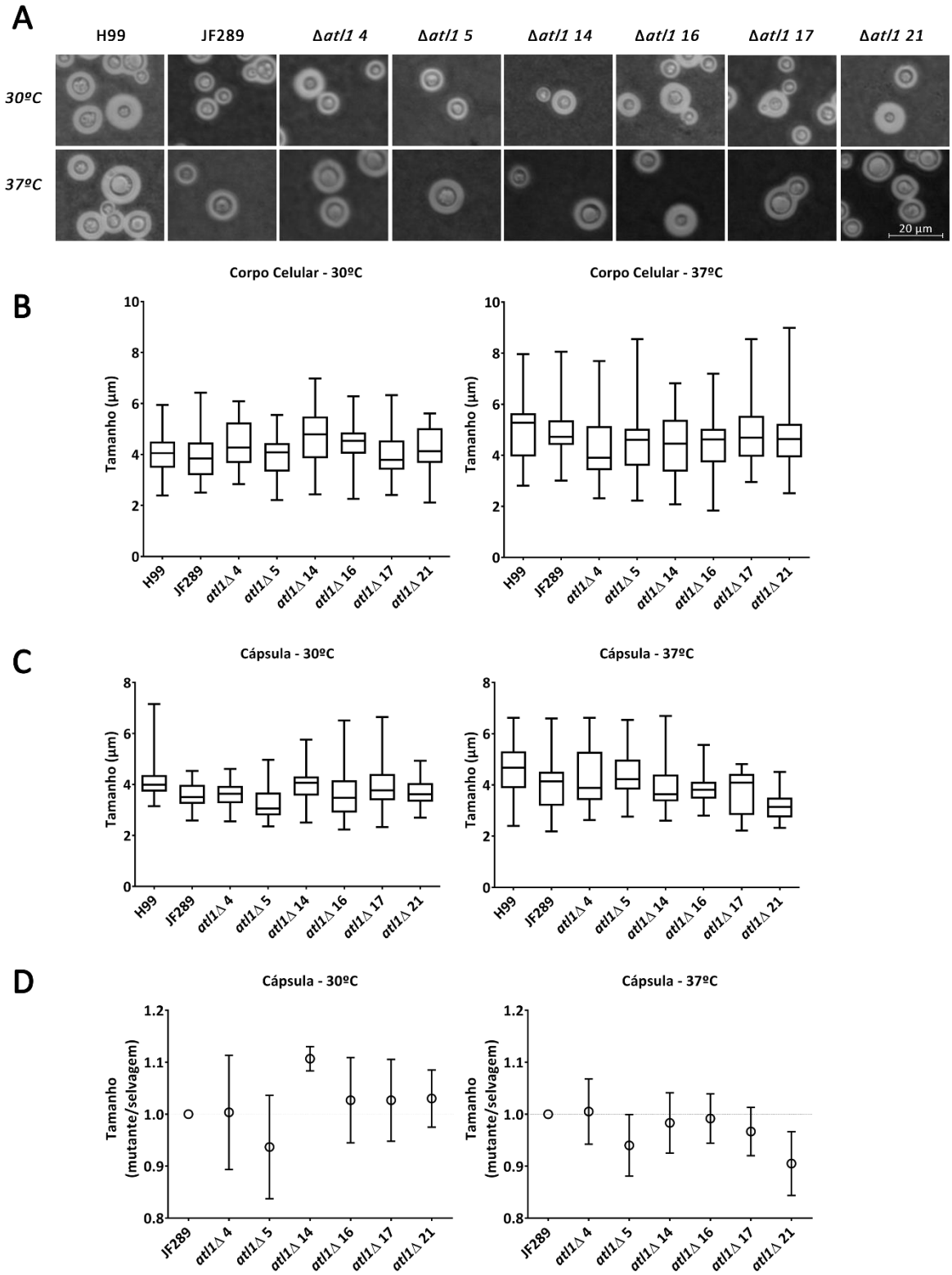


Figura 23: Expansão da cápsula polissacarídica de linhagens *atl1*Δ. H99 e JF289: linhagens controle. **A.** Fotomicrografia de células de *C. neoformans* após coloração com tinta nanquim. A indução da expansão da cápsula foi realizada a 30 e 37ºC. **B.** Gráfico de dispersão do tamanho do corpo celular. **C.** Gráfico de dispersão do tamanho da cápsula polissacarídica. **D.** Gráfico da razão entre tamanho da cápsula polissacarídica da linhagem teste (mutante) e a linhagem selvagem JF289. Não houve diferença estatística entre o tamanho da cápsula de mutantes e selvagem; $p > 0,05$.

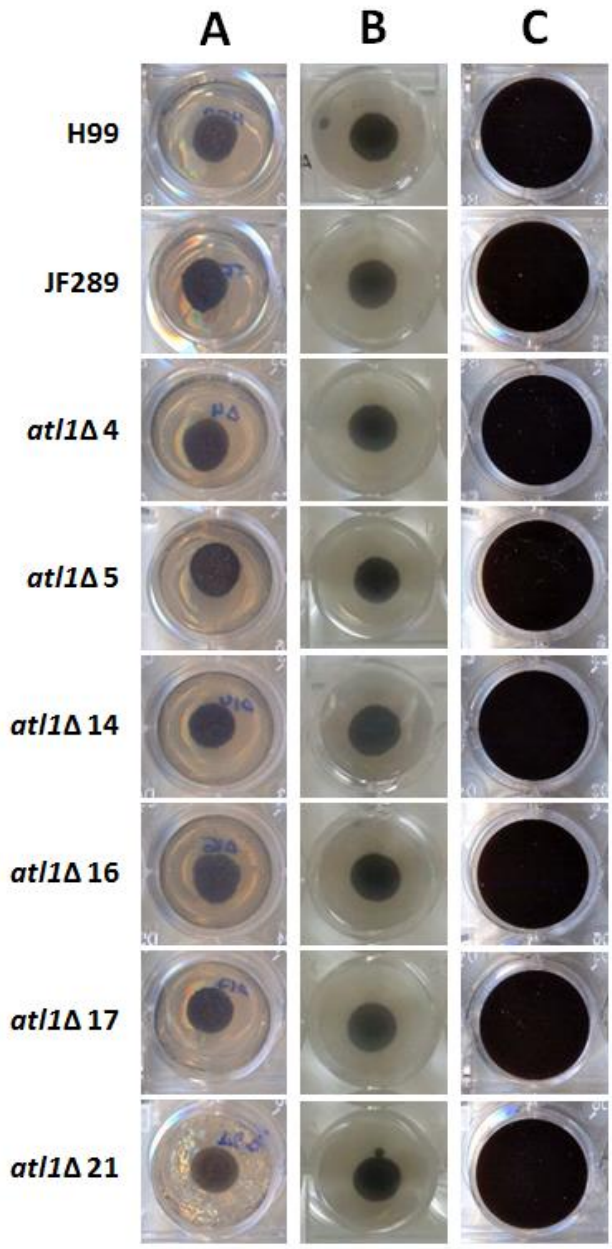


Figura 24: Produção de melanina por células *atl1*Δ. H99 e JF289: linhagens controle. **A.** MM sólido suplementado com L-dopa 1 mM, a 30ºC, após 48h de indução. **B.** MM sólido suplementado com L-dopa 1mM, a 37ºC, após 96h. **C.** MM líquido suplementado com L-dopa 1mM, a 30ºC, após 48h.

Em 1994, Torres-Guerrerro e Edman obtiveram, por meio de mutagênese induzida por EMS, diversas linhagens mutantes de *C. neoformans* que apresentavam deficiência na produção de melanina. EMS é um agente mutagênico que provoca a alcilação da posição O^6 da guanina (LAWLEY & MARTIN, 1975; SEGA, 1984; HAUGHN & SOMERVILLE, 1987; SIKORA et al., 2011 apud MOHD-YUSOFF et al., 2015), gerando dano de DNA que é reparado por proteínas ATL1 (PEARSON et al., 2006; MARGISON et al., 2007; TUBBS &

TAINER, 2010). No entanto, verificou-se no presente estudo que células *atl1*Δ são capazes de produzir melanina como a linhagem H99 e JF289 (Figura 24). Não foi obtido sucesso na indução de produção de melanina em MM líquido a 37ºC.

Enquanto a 30ºC a produção de melanina se dá com 48 horas de incubação, a 37ºC é necessária incubação por períodos mais longos (96 horas), tanto para o mutante quanto para o controle. Albuquerque e colaboradores (2013) demonstraram que a melanização é um fenótipo que depende da densidade celular. Desse modo, o atraso na melanização a 37ºC pode estar relacionado ao crescimento mais lento do fungo nessa temperatura (Figura 22).

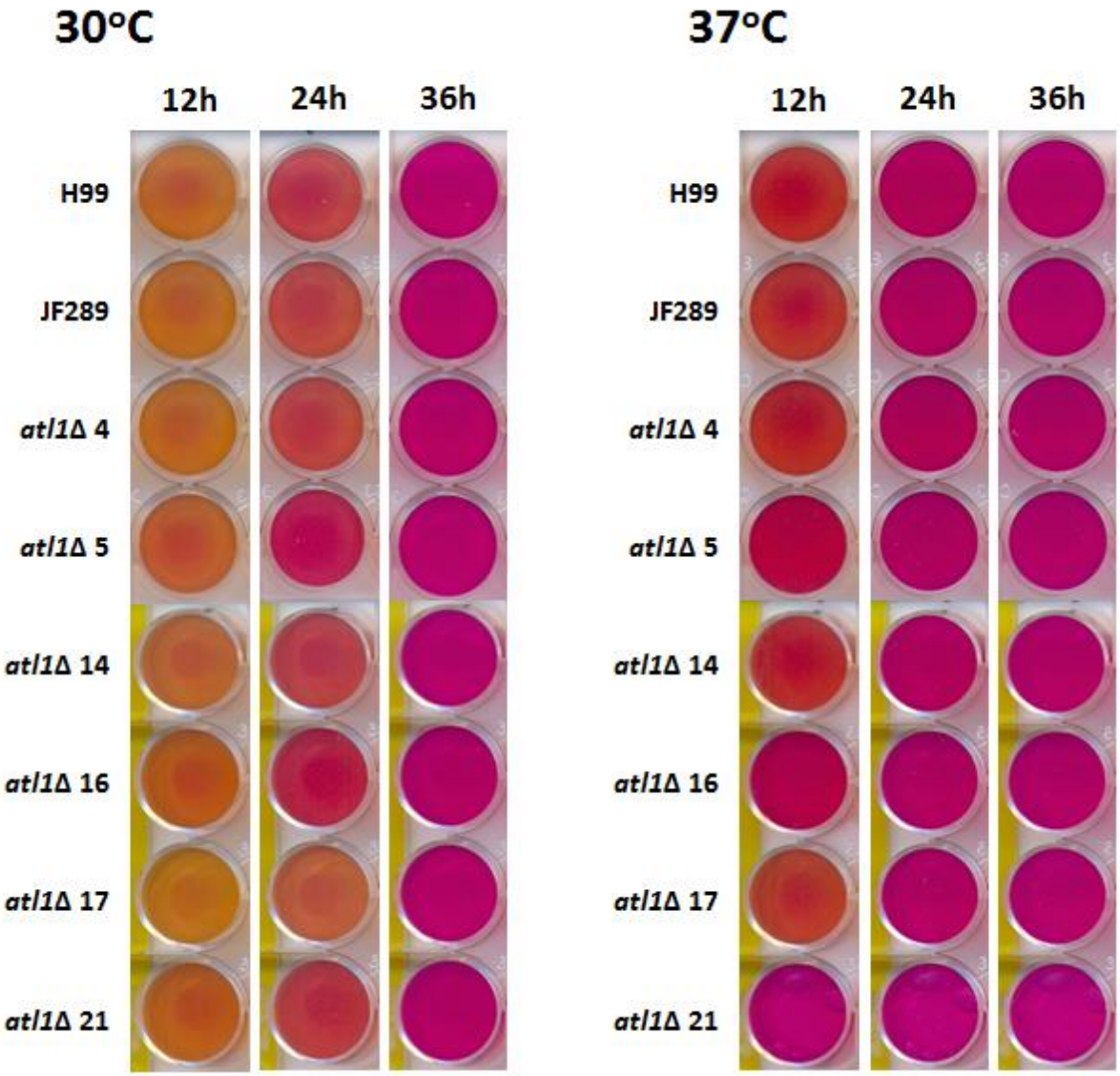


Figura 25: Produção de urease por células *atl1*Δ. H99 e JF289: linhagens controle. Foi realizada indução de produção de urease a 30 e 37ºC. A produção de urease é evidenciada pela mudança de coloração do meio sólido, de amarelado para cor-de-rosa.

Outro fator de virulência analisado foi a produção de urease. Observou-se que a 30ºC a produção de urease ocorreu mais lentamente que a 37ºC (Figura 25). Não se detectou diferença entre mutantes e controles. Tais resultados indicam que o gene putativo *ATL1* também não é requerido para a expressão desse importante fenótipo de virulência, que desempenha papel tanto na infecção pulmonar (OSTERHOLZER et al., 2009) como na cerebral (SINGH et al., 2013).

5.4 *ATL1* não é requerido para a virulência de *C. neoformans* em *G. mellonella*

A correlação entre a virulência em *G. mellonella* e em modelos animais sugere que *G. mellonella* pode ser usada como modelo para a identificação de novos genes em *C. neoformans* que estão envolvidos com virulência (MILONAKIS et al., 2005). De fato, genes que apresentaram hipovirulência em camundongos, como mutantes para genes de histona desacetilase *hos2*Δ e *rpd3*Δ (LIU et al, 2008 apud BRANDÃO et al., 2018), também demonstraram-se hipovirulentas em *G. mellonella* (BRANDÃO et al., 2018).

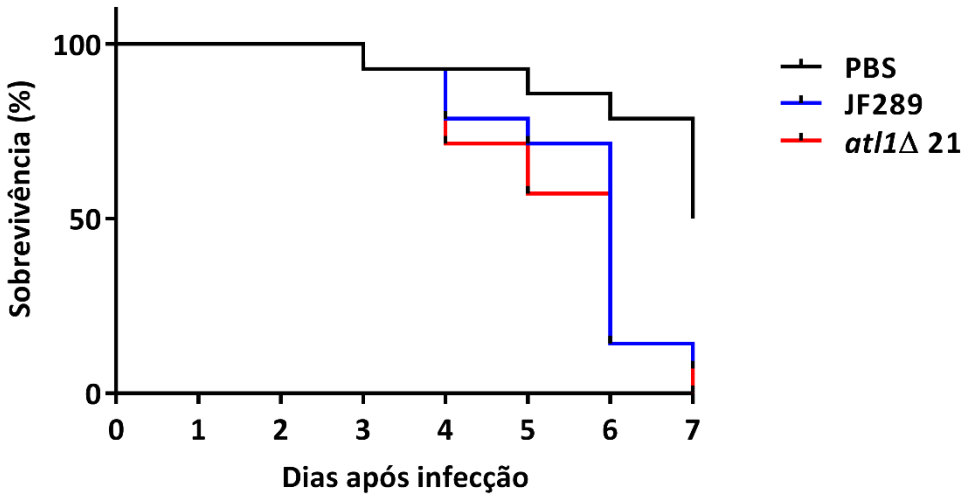


Figura 26: Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectada com linhagens *atl1*Δ e JF289 de *C. neoformans*. *atl1*Δ 21 foi a linhagem mutante utilizada nesse teste. PBS foi utilizado como controle negativo de infecção. Não houve diferença estatística entre a infecção por JF289 e *atl1*Δ, $p > 0,05$; houve diferença estatística entre as condições teste e controle negativo de infecção, $p \leq 0,0038$.

Os mutantes *atl1*Δ, por sua vez, apresentam virulência semelhante a linhagem JF289 em *G. mellonella* (Figura 26). Linhagens de *Salmonella enterica* mutantes para genes de reparo de alcilação de DNA (*ADA* e outros genes), que apresentaram sensibilidade a agentes

alcilantes, também não tiveram a virulência afetada, mesmo quando dois ou três desses genes foram mutados simultaneamente (ÀLVAREZ et al., 2010).

5.5 *ATL1* não é requerido para o estabelecimento do ciclo sexual em *C. neoformans*

Experimentos de cruzamento sexual entre as linhagens *atl1*Δ (MAT**a**) e a linhagem H99 (MATα) foram realizados a fim de se verificar se o gene putativo *ATL1* é requerido para o estabelecimento do ciclo sexual em *C. neoformans*. Verificou-se que, nos cruzamentos realizados em meio FA, houve formação mais abundante de hifas de acasalamento em comparação ao meio MS. No entanto, ao contrário dos cruzamentos realizados em meio FA, em meio MS foi possível detectar cadeias de esporos e essas apresentam morfologia normal (Figura 27). A formação de esporos sugere que as linhagens mutantes *atl1*Δ de *C. neoformans* são férteis em cruzamentos sexuais.

Fraser e colaboradores (2003) constataram que a maioria das linhagens do surto de criptococose em Vancouver eram férteis e decorrentes de eventos de recombinação recentes. Feretzaki e colaboradores (2014) verificaram que a linhagem hiperfilamentosa XL280α, capaz de realizar autocruzamento α-α, e que foi gerada a partir do cruzamento sexual entre as linhagens JEC20**a** e JEC21α, mostra-se mais virulenta, no modelo murino de infecção, que a linhagem parental JEC21α. Tais estudos ilustram a possível relação entre a recombinação meiótica, resultante do ciclo sexual, e a virulência em *C. neoformans*. Os mutantes *atl1*Δ, da mesma forma que não apresentaram deficiência na expressão dos fatores de virulência *in vitro* e na virulência no modelo *G. mellonella*, também não apresentaram deficiência no estabelecimento do ciclo sexual em comparação às linhagens férteis JF289 e H99.

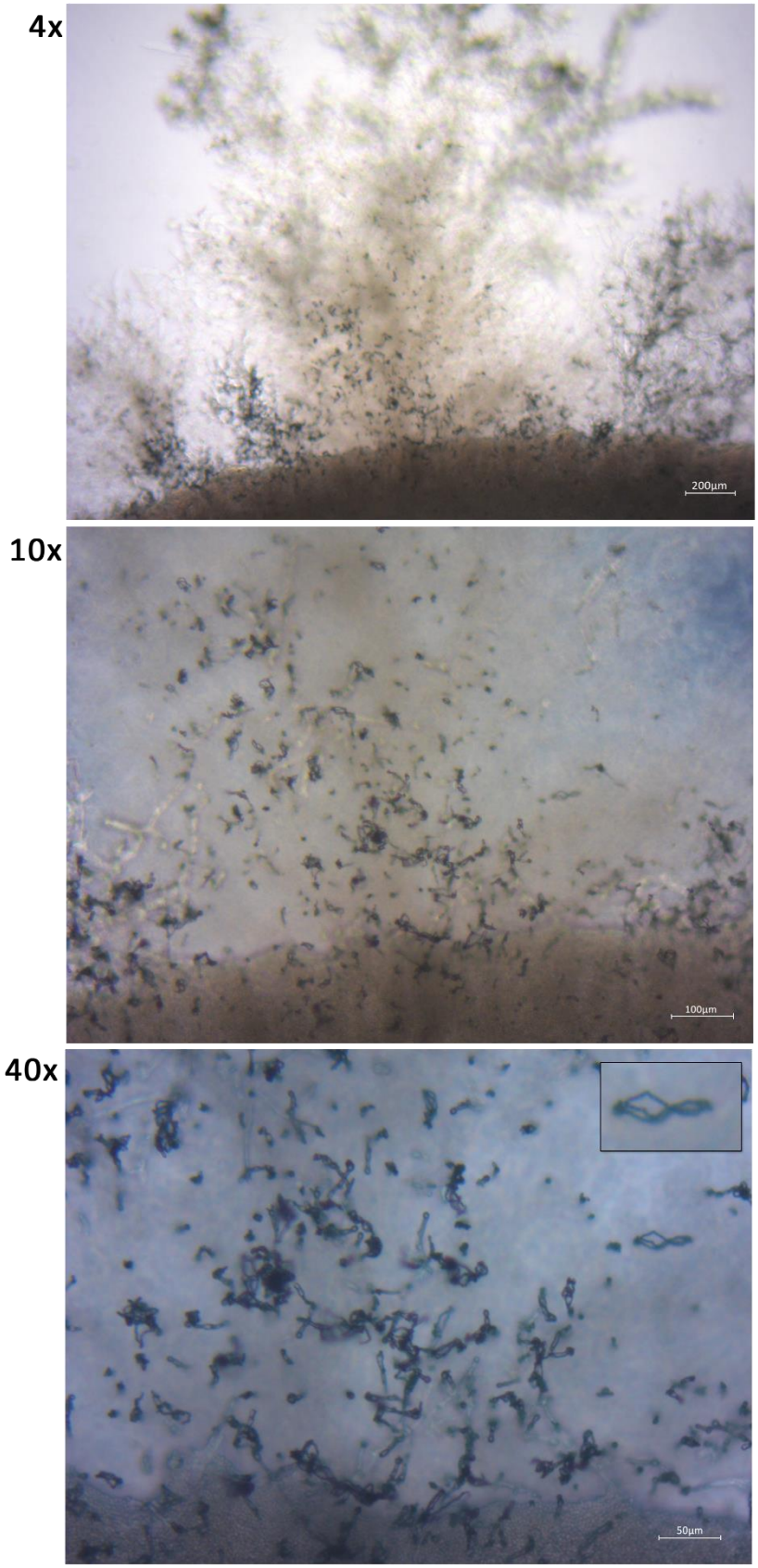


Figura 27: Fotomicrografia da margem periférica de *spot* de cruzamento sexual entre as linhagens *atl1*Δ e H99. Realizado em meio MS. Hifas de acasalamento são observadas nos aumentos 4X e 10X. Cadeias de esporos com morfologia normal são observadas no aumento 10X e, mais claramente, no 40X.

Salienta-se que, embora nos cruzamentos entre as linhagens *atl1*Δ e H99 tenham sido detectadas hifas de acasalamento e cadeias de esporos de morfologia normal, não se avaliou ainda a taxa de germinação desses esporos em relação a um cruzamento controle. Além disso, a avaliação de um possível papel do gene putativo *ATL1* na reprodução sexual de *C. neoformans* requer o cruzamento entre linhagens *atl1*Δ de idiotipos de acasalamento opostos, uma vez que o alelo selvagem de H99 pode ter sido o responsável pela realização completa ciclo reprodutivo observada no presente estudo.

5.6 As linhagens *atl1*Δ apresentam resposta semelhante a de linhagens selvagens a diferentes condições de estresse

O crescimento das linhagens *atl1*Δ foi analisado em diversas condições de estresse. Inicialmente, os transformantes foram submetidos a estresse osmótico, causado por KCl e NaCl 1,5M, 2M e por sorbitol 2,5M. Nessas condições de estresse osmótico, linhagens *atl1*Δ cresceram como as linhagens selvagens (Figura 28). Zhang e colaboradores (2016), na caracterização de *C. neoformans* mutante para *CTR4*, gene que codifica transportador de membrana plasmática, verificaram hipersensibilidade a KCl e NaCl (2M).

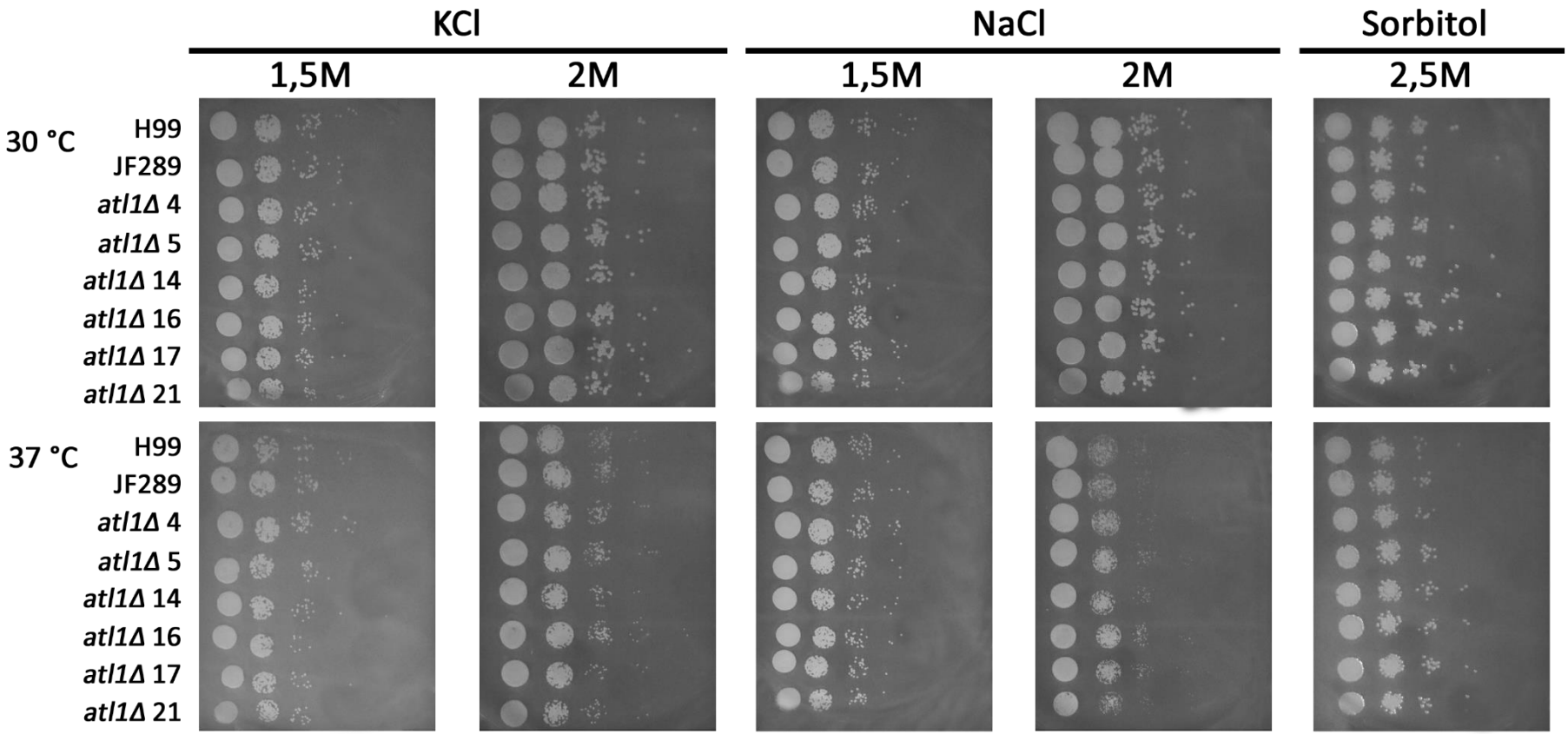


Figura 28: Crescimento das linhagens *atl1*Δ sob condições de estresse osmótico. Linhagens *atl1*Δ oriundas do 1º experimento de transformação. H99 e JF289: linhagens controle (WT). As imagens correspondentes ao crescimento em KCl e NaCl 1,5M foram obtidas após 72h de incubação, enquanto as correspondentes ao crescimento em KCl e NaCl 2M foram registradas após 96h e as de crescimento em sorbitol, após 120h.

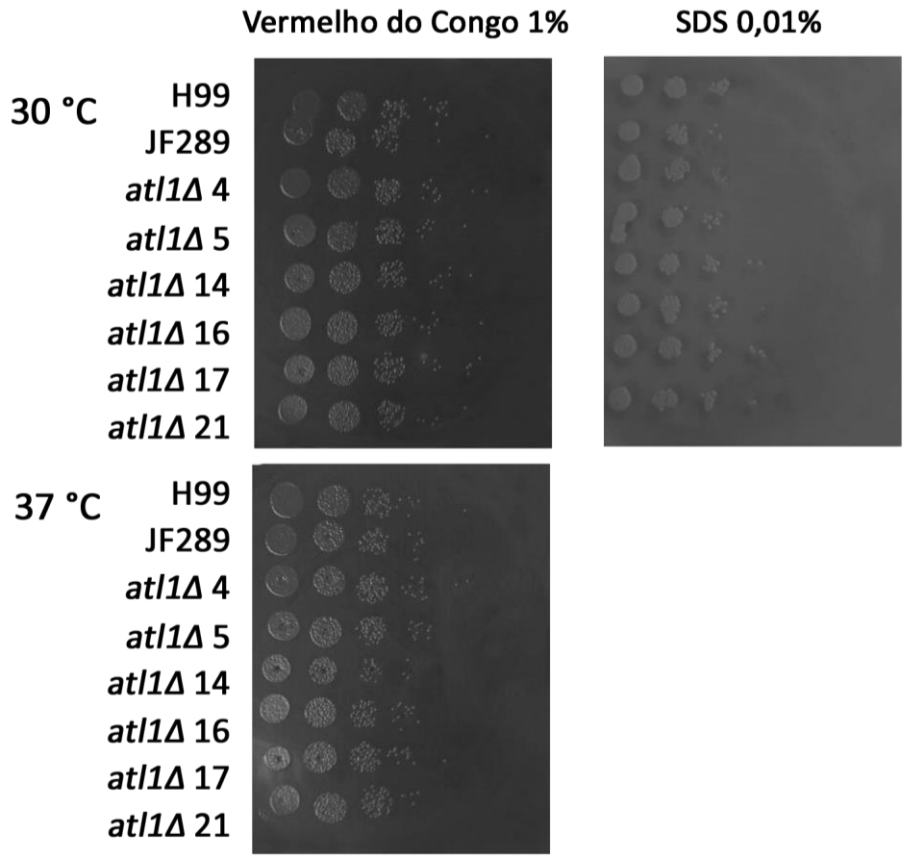


Figura 29: Crescimento das linhagens *atl1*Δ sob condições de estresse de parede celular. As linhagens mutantes *atl1*Δ (1º experimento de transformação) e controles (H99 e JF289) foram crescidas a 30 e 37ºC em vermelho do Congo 1%, por 48h, ou SDS 0,01%, por 120h.

O crescimento das linhagens *atl1*Δ foi analisado também em condições de estresse de parede celular causado pelo corante vermelho do Congo e por SDS. Sob estresse causado por vermelho do Congo 0,5% (dado não mostrado) e 1% (Figura 29), observou-se que os mutantes *atl1*Δ crescem como as linhagens controle. Embora Hu e Kronstad (2010) tenham utilizado SDS na concentração de 0,1% para induzir estresse de parede em *C. neoformans* mutante para *APT1*, que codifica uma ATPase de membrana predita, no presente trabalho não houve crescimento celular nem mesmo das linhagens controle nessa concentração em nenhuma temperatura analisada, mesmo após mais de uma semana de incubação (dado não mostrado). Utilizando-se SDS na concentração de 0,01%, como Zhang e colaboradores (2016) empregaram para a caracterização de *C. neoformans* mutante para o gene de transportador de membrana plasmática *CTR4*, no qual observou-se hipersensibilidade, houve crescimento comparável entre as linhagens mutantes e controles a 30ºC (Figura 29); a 37ºC não houve crescimento celular nem mesmo das linhagens controle (dado não mostrado). Assim,

verificou-se que linhagens *atl1*Δ não apresentam diferença na susceptibilidade a condições de estresse de parede celular em comparação às linhagens controle.

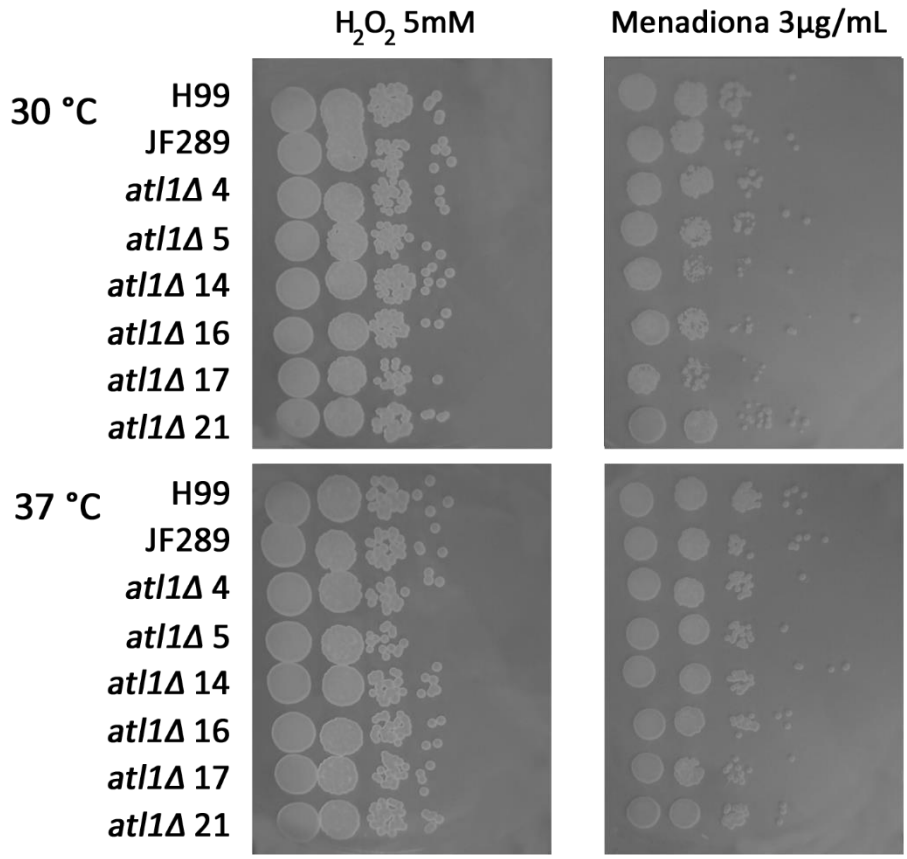


Figura 30: Crescimento das linhagens *atl1*Δ sob condições de estresse oxidativo. As linhagens mutantes *atl1*Δ (1º experimento de transformação) e controles (H99 e JF289) foram crescidas a 30 e 37ºC na presença de H_2O_2 5mM, por 48h, ou menadiona 3µg/mL, por 72h.

Em seguida, o crescimento dos mutantes *atl1*Δ foi analisado sob condições de estresse oxidativo. Nessa análise, foram utilizados H_2O_2 5mM e menadiona 3µg/mL como agentes estressores. Linhagens *atl1*Δ apresentaram crescimento similar às controle na presença dos dois agentes (Figura 30). Vu e colaboradores (2015), na caracterização de *C. neoformans* mutante para *MID1*, gene que codifica constituinte do complexo canal de Ca^{2+} CMC, e Zhang e colaboradores (2016), na caracterização de *C. neoformans* mutante para *CTR4*, gene que codifica transportador de membrana plasmática, verificaram diferença de crescimento entre mutantes e controle em concentrações de H_2O_2 inferiores às utilizadas nesse trabalho (3mM e 0,15%). Hu e Kronstad (2010) verificaram diferença fenotípica em *C. neoformans* mutante para *APT1*, que codifica uma ATPase de membrana predita, na presença de H_2O_2 5mM.

Zhang e colaboradores (2016) também verificaram hipersensibilidade de *ctr4*Δ na presença de menadiona na mesma concentração utilizada nesse estudo (3μg/mL).

As linhagens *atl1*Δ também foram submetidas a diferentes pHs. Durante o crescimento celular de linhagem de *S. cerevisiae*, foi observada significante acidificação do meio de cultura contendo 2% de glicose (mesma concentração utilizada nesse estudo): após 96 horas de crescimento, o pH variou de um valor inicial em torno de 4,0 para 2,82 (BURTNER et al., 2009). Portanto, no presente estudo foram utilizados meio de cultura com pH ajustado com e sem a adição de tampão.

Verificou-se que em meio YPD com adição de tampão acetato (para ajustar pH para 4), não há nenhum crescimento celular, nem mesmo das linhagens controle, a 30 ou 37ºC (dado não mostrado). Ácido acético, constituinte do tampão acetato, foi previamente identificado como sendo tóxico e mediador de morte-celular em levedura de *S. cerevisiae* (BURTNER et al., 2009); em *C. neoformans*, esse ácido pode ter papel semelhante, o que justificaria o resultado. Em meio de cultura com pH 4, com ou sem adição de tampão citrato, ou pH 8, com ou sem tampão Tris-HCl, mutantes *atl1*Δ não apresentaram diferença no crescimento (Figura 31).

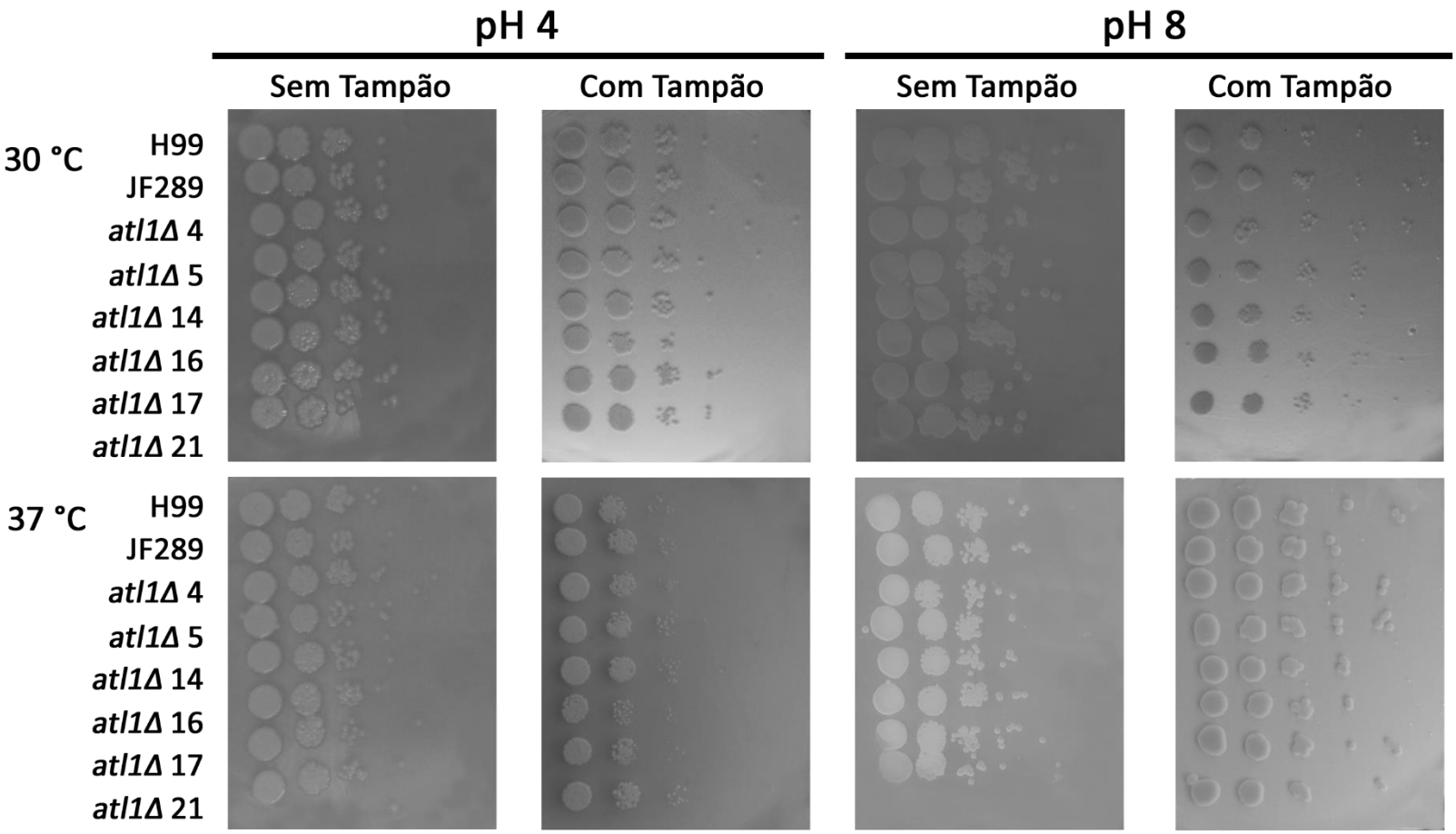


Figura 31: Crescimento das linhagens *atl1*Δ em diferentes pHs. As linhagens mutantes *atl1*Δ (1º experimento de transformação) e controles (H99 e JF289) foram crescidas a 30 e 37ºC em meio YPD pH 4, com e sem adição de tampão citrato, ou pH 8, com e sem adição de tampão Tris-HCl. Imagens correspondentes ao crescimento em pHs sem tampão foram obtidas após 96h de incubação, enquanto aquelas de crescimento em pHs com tampão a 30ºC foram obtidas após 72h e as de crescimento em pHs com tampão a 37ºC, após 120h.

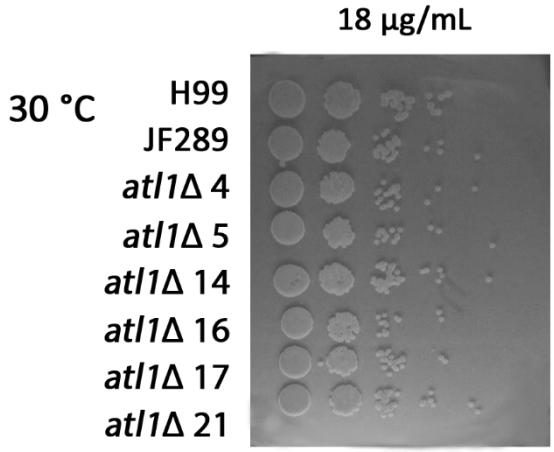


Figura 32: Crescimento das linhagens *atl1*Δ em meio YPD contendo fluconazol. Linhagens mutantes *atl1*Δ (1º experimento de transformação) e controles (H99 e JF289) crescidas a 30ºC em meio YPD contendo fluconazol 18 µg/mL, após 72h.

Fluconazol, antifúngico cujo alvo é a enzima 14-α-desmetilase do citocromo P450 (Erg11) e inibe a conversão de lanosterol em ergosterol, é amplamente utilizado no tratamento de criptococose. Linhagens de *C. neoformans* mutantes, como o duplo mutante para os genes da via de sinalização Ras/AMPc *HOG1* e *CAC1* (MAENG et al., 2010) e o mutante para gene de resposta a estresse *yap1*Δ (PAUL et al., 2015), demonstram hipersensibilidade a esse antifúngico. *atl1*Δ, por sua vez, apresenta crescimento compatível com o das linhagens controle na presença de fluconazol, a 30ºC (Figura 32). A 37ºC, nem mesmo as linhagens controle são capazes de crescer na presença de 18 µg/mL do antifúngico (dado não mostrado).

5.7 As linhagens *atl1*Δ apresentam resposta semelhante a de linhagens selvagens aos agentes mutagênicos radiação UV e hidroxiurea

Como a provável proteína codificada pelo putativo gene *ATL1* está relacionada com reparo de DNA, o crescimento dos mutantes após exposição à radiação UV e em presença do agente genotóxico hidroxiurea (HU) 50 mM foi avaliado.

C. neoformans mutante para o gene *UVE1*, que codifica uma endonuclease atuante na via de reparo de excisão dependente de UVDE (UVER), mostrou-se sensível a radiação UV na intensidade de 120 J/m^2 (VERMA & IDNURM, 2013), enquanto que a exposição à radiação UV 240 J/m^2, ou intensidades menores (dado não mostrado), não provocaram nenhuma diferença de crescimento de *atl1*Δ em relação aos controles (Figura 33). A

exposição a 480 J/m^2, ou intensidades maiores (dado não mostrado), mostrou-se letal (Figura 33).

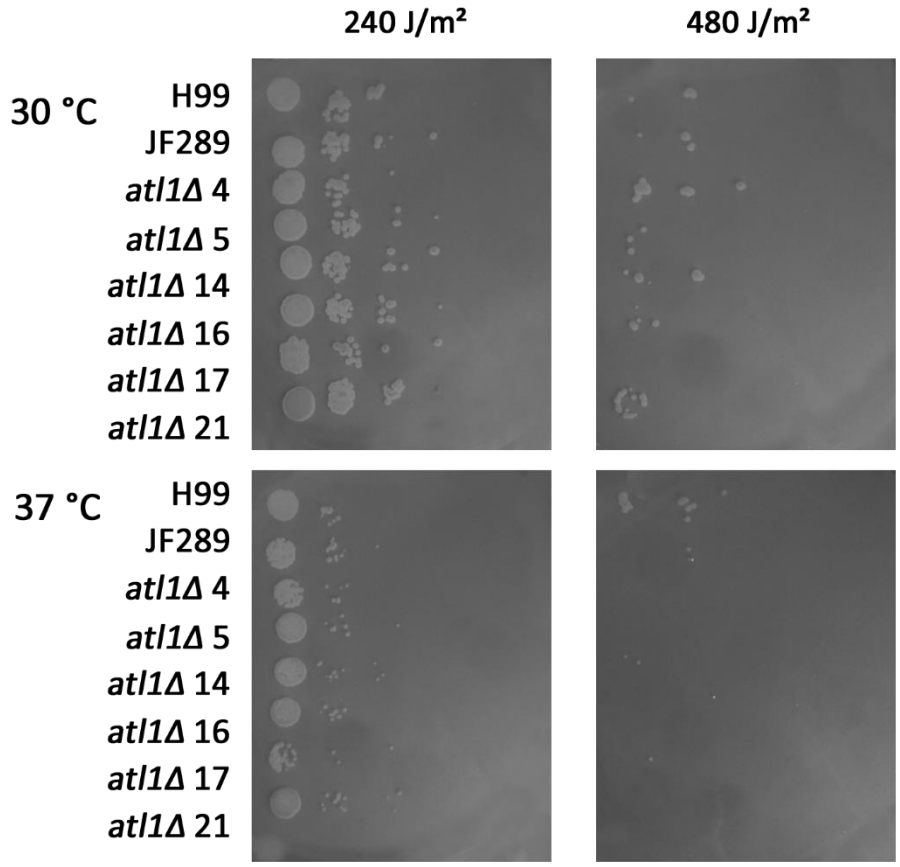


Figura 33: Crescimento das linhagens atl1Δ após exposição à radiação UV. As **l**inhagens mutantes *atl1*Δ (1º experimento de transformação) e controles (H99 e JF289) foram crescidas após exposição à radiação UV na intensidade de 240 e 480 J/m^2, a 30 e 37ºC, por 72h.

Mutantes *atl1*Δ também apresentaram crescimento semelhante aos controles na presença de HU (Figura 34). Embora cause danos ao DNA, HU não é um agente alcilante, o que pode justificar a igual resposta, do mutante e dos controles, a esse agente. Em crescimento em concentração de HU inferior a empregada nesse trabalho (30 mM), foi verificada hipersensibilidade de linhagens de *C. neoformans* mutantes para genes da via de sinalização Ras/AMPc (MAENG et al., 2010).

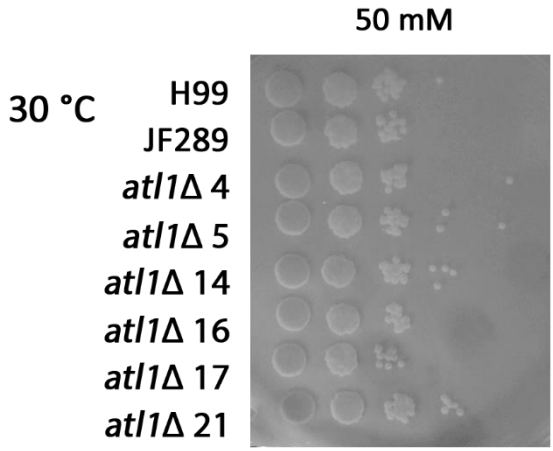


Figura 34: Crescimento das linhagens *atl1*Δ em meio YPD contendo hidroxiureia. As linhagens mutantes *atl1*Δ (1º experimento de transformação) e controles (H99 e JF289) foram crescidas foram crescidas em meio YPD acrescido de HU 50mM, a 30ºC, por 72h.

5.8 Mutantes *atl1*Δ apresentam sensibilidade aumentada ao agente alcilante EMS

Em continuação à caracterização fenotípica dos mutantes para o gene putativo *ATL1* de *C. neoformans*, avaliou-se o efeito da exposição a agentes alcilantes sobre o crescimento celular. Nesse estudo, foram utilizados três agentes alcilantes: etil metanossulfonato (EMS), metil metanossulfonato (MMS) e etil nitrosourea (ENU). EMS e MMS fazem parte do mesmo grupo de agentes alcilantes, o dos alcil metanossulfonatos, enquanto ENU faz parte do grupo dos nitrosamidas. Esses agentes são mutagênicos para uma ampla variedade de organismos (BERANEK, 1990).

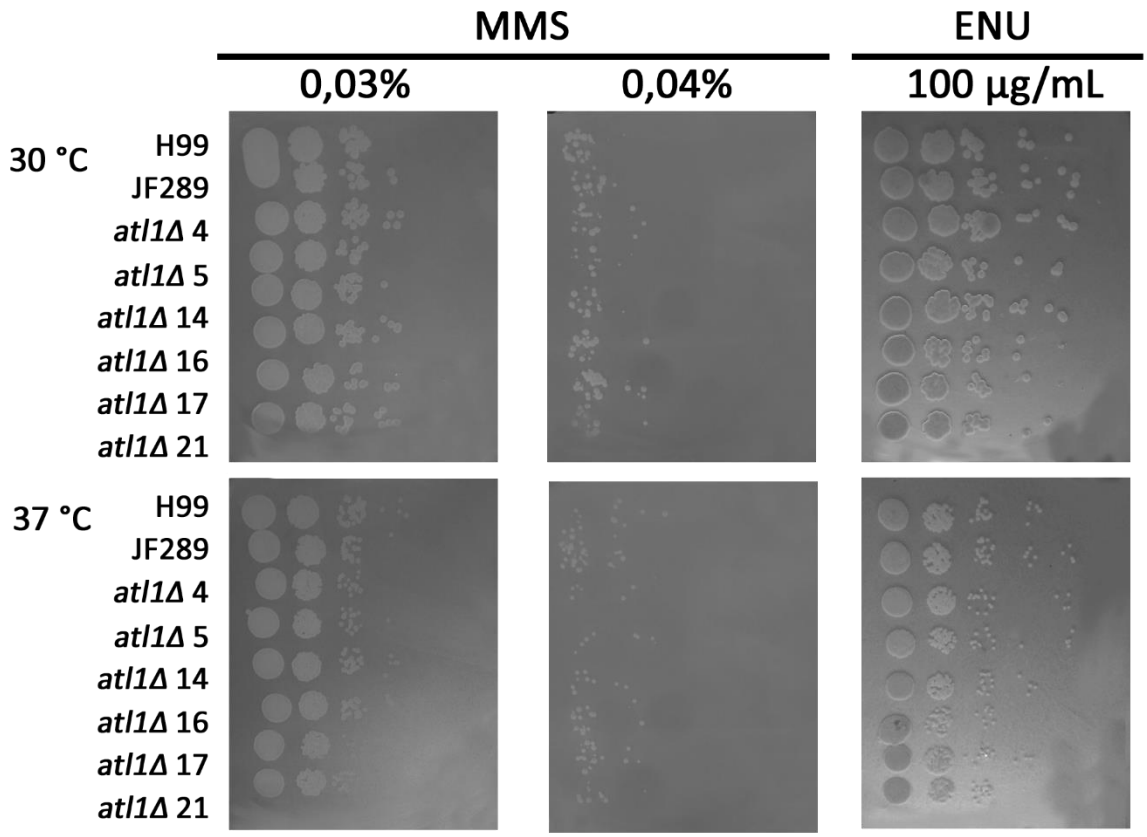


Figura 35: Crescimento das linhagens *atl1*Δ em meio YPD contendo os agentes alcilantes MMS e ENU. As linhagens *atl1*Δ (1º experimento de transformação) e controles (H99 e JF289) foram crescidas em meio YPD acrescido de MMS e ENU, a 30 e 37ºC. As imagens de crescimento em MMS 0,03% foram obtidas após 48h de incubação, as de MMS 0,04% após 96h e as de ENU 100 µg/mL após 72h.

Os mutantes *atl1*Δ não apresentaram maior sensibilidade a MMS na concentração de 0,03% (Figura 35), embora esse agente seja capaz de transferir o grupo metila para o DNA. Concentrações de MMS superiores a 0,04% levaram à inibição do crescimento mesmo das linhagens controle (Figura 35). Para a concentração de 0,06% não se observou crescimento celular (dado não mostrado).

A concentração de MMS 0,03% foi empregada por Maeng e colaboradores (2010) para a caracterização de linhagens de *C. neoformans* mutantes para genes relacionados à via de sinalização Ras/cAMP, e por Tripathi e colaboradores (2012) para a caracterização de linhagens de mutantes para *ISC1*, gene da via de síntese de esfingolipídeo. Em ambos estudos foi observada hipersensibilidade para os mutantes.

Previamente, Pearson e colaboradores (2006) haviam utilizado MMS na concentração de 68,8µg/mL para a caracterização de mutantes *atl1*Δ de *S. pombe*, e observaram diferença fenotípica. No entanto, Latypov e colaboradores (2012), ao demonstrarem que *ATL1*

desempenha um papel central na via NER de reparo, verificaram que linhagem *atl1*Δ de *S. pombe* não é sensível a MMS 50μg/mL.

MMS gera baixos níveis de O^6-meG no DNA (SINGER & GRUNBERGER, 1983; BERANEK, 1990). Esse agente alcilante modifica prioritariamente guanina para N^7-metilguanina, que provoca erro no pareamento de bases, e adenina para N^3-metiladenina, que leva a bloqueio de replicação (SINGER & GRUNBERGER, 1983; BERANEK, 1990; LUNDIN et al., 2005). Assim, os danos de DNA induzidos por MMS são diferentes de O^6-meG, que é o tipo de dano reparado pela proteína Atl1.

Os agentes etilantes, embora menos reativos, apresentam maior afinidade para modificar oxigênios (SINGER & GRUNBERGER, 1983) e maior ação mutagênica que os agentes metilantes (SINGER, 1985; DEN ENGELSE et al., 1986 apud BERANEK, 1990). Diante disso, também foi analisada a sensibilidade de *atl1*Δ a ENU e EMS.

Não foi observada diferença no crescimento das linhagens *atl1*Δ em relação às linhagens controle quando expostos a ENU na concentração de 100μg/mL (Figura 35). Nessa mesma concentração de ENU, em ensaio realizado por cultura em meio líquido, havia sido observada maior sensibilidade de *S. pombe* mutante para *ATL1* em relação ao WT (PEARSON et al., 2006). Latypov e colaboradores (2012) verificou sensibilidade de *atl1*Δ de *S. pombe* a ENU 200μg/mL, em meio sólido.

As principais mutações causadas por ENU são transversões A:T/T:A e transições A:T/G:C (>82% das mutações sequenciadas) (POPP et al., 1983; NOVEROSKE et al., 2000; KENNEDY & BRYAN, 2006). O grupo etila do ENU pode ser transferido para vários sítios reativos no DNA, incluindo O^6 de guanina, (SINGER & GRUNBERGER, 1983; SHIBUYA & MORIMOTO, 1993; NOVEROSKE et al., 2000) que, se não reparado, resulta em erro de pareamento e substituição de base (JUSTICE et al., 1999 apud KENNEDY & BRYAN, 2006). ENU apresenta inclusive maior porcentagem de alcilação da posição O^6 de guanina que EMS (SINGER & GRUNBERGER, 1983; BERANEK, 1990). Portanto, para se confirmar esse resultado, a sensibilidade de *atl1*Δ de *C. neoformans* a ENU deve ser analisada utilizando-se maiores concentrações desse agente etilante.

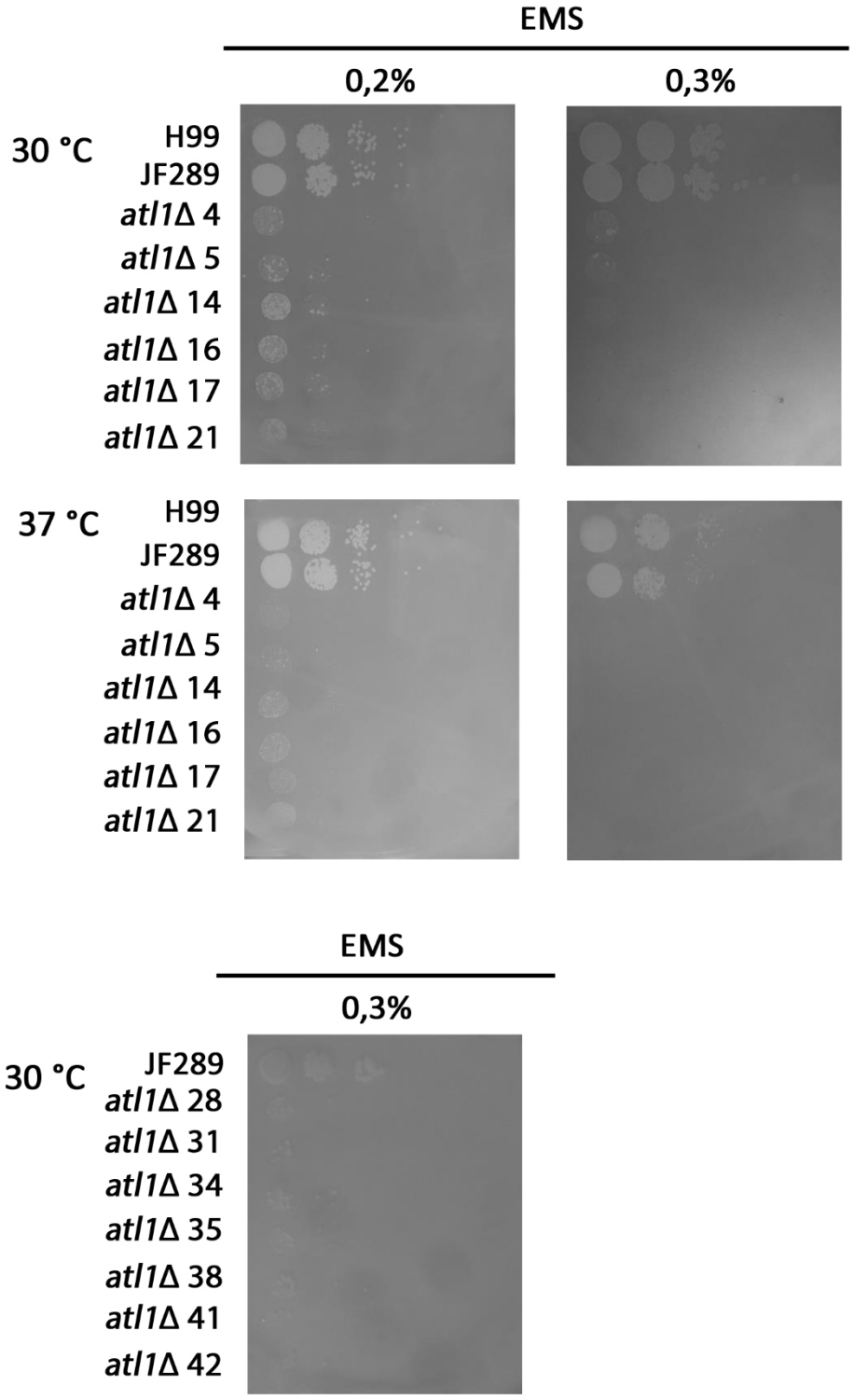


Figura 36: Crescimento das linhagens *atl1*Δ em meio YPD contendo o agente alcilante EMS. A. As linhagens *atl1*Δ (1º experimento de transformação) e controles (H99 e JF289) foram crescidas em meio YPD acrescido de EMS 0,2 e 0,3%, a 30 e 37ºC. **B.** Crescimento das linhagens *atl1*Δ (2º experimento de transformação) e da linhagem controle JF289 em presença de EMS 0,3% a 30ºC. As imagens de crescimento em EMS 0,2% foram obtidas após 48h de incubação, as de EMS 0,3% foram obtidas após 96h.

Os isolados mutantes *atl1*Δ apresentaram sensibilidade aumentada ao agente mutagênico EMS, quando comparados às linhagens controle, particularmente a 37ºC (Figura 36A). Tal sensibilidade também foi verificada para as linhagens resultantes do 2º experimento de transformação (Figura 36B). Verificou-se ainda que a hipersensibilidade dos mutantes é dose dependente: ao se aumentar a concentração de EMS para 0,3%, a deficiência de crescimento foi mais evidente, e a 37ºC não se observou crescimento algum dos mutantes (Figura 36A). Tais dados indicam que a sensibilidade a EMS está diretamente relacionada à deleção do gene putativo *ATL1*.

Mutante *atl1*Δ de *S. pombe* apresentou sensibilidade aumentada aos alcil metanossulfonatos, principalmente ao EMS (PEARSON et al., 2006). A sensibilidade aumentada dos mutantes *atl1*Δ de *C. neoformans* ao EMS pode ser reflexo das maiores quantidades de O^6-alcilguanina (O^6-alcilG) geradas no DNA em comparação ao MMS, por exemplo (SINGER & GRUNBERGER, 1983; SAFFHILL et al., 1985 apud PEARSON et al., 2006; BERANEK, 1990). De fato, EMS induz transições G:C/A:T, que ocorrem principalmente pela alcilação da posição O^6 ou da posição N^7 da guanina, o que leva à mudança do pareamento com citosina por pareamento com timina (LAWLEY & MARTIN, 1975; SEGA, 1984; HAUGHN & SOMERVILLE, 1987; SIKORA et al., 2011 apud MOHD-YUSOFF et al., 2015).

Agt de mamíferos também é capaz de remover o grupo etila de O^6-etilguanina (O^6-etG), embora mais lentamente que remove o grupo metil de O^6-meG (MEHTA et al., 1981; PEGG et al., 1983). Atl1, por sua vez, forma complexos estáveis com vários resíduos O^6-alcilG (LATYPOV et al., 2012). Resultados de ELISA revelaram baixa afinidade de Atl1 por oligodesoxirribonucleotídeos contendo O^6-meG e maior afinidade com substratos contendo outras lesões, sendo O^6-etG intermediário (LATYPOV et al., 2012).

Especula-se que a CNAG_02105 codifique uma Atl1 um *C. neoformans*, face à similaridade da proteína predita por essa sequência com proteínas Atl1 de outros organismos. A sensibilidade aumentada dos mutantes *atl1*Δ ao EMS corrobora para a identificação desse gene como putativo *ATL1* nesse fungo patogênico.

6. CONCLUSÃO

Análises de bioinformática sugerem que a sequência CNAG_02105 de *C. neoformans* codifique a proteína de reparo de DNA alcilado Atl1. Por meio da técnica de deleção gênica por *Double-joint* PCR seguida de transformação por biobalística, obteve-se linhagens mutantes *atl1*Δ, que apresentam a ORF desse putativo gene substituída pelo gene de resistência a neomicina (*NEO*).

A termotolerância, a expansão da cápsula polissacarídica, a melanização da parede celular, a secreção de urease ativa, a capacidade de completar o ciclo sexual e a virulência em *G. mellonella* não foram afetadas pela deleção de *ATL1*. Mutantes *atl1*Δ, quando comparados às linhagens H99 e JF289, também não apresentaram diferenças fenotípicas no tocante à resposta ao estresse osmótico, oxidativo e de parede celular, a diferentes pHs do meio de cultura, à sensibilidade à radiação UV e ao crescimento em presença de hidroxiureia e fluconazol. As linhagens mutantes *atl1*Δ mostraram-se hipersensíveis à presença do agente alcilante EMS, mas não a MMS ou ENU 100μg/mL.

Coletivamente, os dados obtidos sugerem que a sequência CNAG_02105 codifique uma putativa proteína Atl1 de *C. neoformans*.

7. PERSPECTIVAS

As próximas etapas do presente trabalho são:

- Analisar *Southern blot* para a verificação da inserção do cassete de deleção no lócus correto e em cópia única;
- Analisar a sensibilidade de *atl1*Δ a maiores concentrações de ENU (≥200μg/mL);
- Analisar a taxa de silenciamento do transgene *URA5* durante a propagação vegetativa (silenciamento mitótico) dos mutantes *atl1*Δ em comparação à linhagem JF289.

REFERÊNCIAS

Albuquerque P., Nicola A. M., Nieves E., Paes H. C., Williamson P. R., Silva-Pereira I. & Casadevall A. (2013). Quorum sensing-mediated, cell density-dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *mBio*, 5(1), e00986-13.

Àlvarez G., Campoy S., Spricigo D. A., Teixidó L., Cortés P. & Barbé J. (2010). Relevance of DNA Alkylation Damage Repair Systems in *Salmonella enterica* Virulence. *Journal of Basteriology*, 192(7), 2006-2008.

Bennett J. E., Kwon-Chung K. J. & Howard D. H. (1977). Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *American Journal of Epidemiology*, 105(6), 582-586.

Beranek D. T. (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research*, 231, 11-30.

Bojarczuk A., Miller K. A., Hotham R., Lewis A., Ogryzko N. V., Kamuyango A. A., Frost H., Gibson R. H., Stillman E., May R. C., Renshaw S. A. & Johnstona S. A. (2016). *Cryptococcus neoformans* Intracellular Proliferation and Capsule Size Determines Early Macrophage Control of Infection. *Scientific Reports*, 6, 21489.

Brandão F. A., Derengowski L. S., Albuquerque P., Nicola A. M., Silva-Pereira I. & Poças-Fonseca M. J. (2015). Histone deacetylases inhibitors effects on *Cryptococcus neoformans* major virulence phenotypes. *Virulence*, 6(6), 618-630.

Brandão F. A., Esher S. K., Ost K. S., Pianalto K., Nichols C. B., Fernandes L., Bocca A. L., Poças-Fonseca M. J. & Alspaugh J. A. (2018). HDAC genes play distinct and redundant roles in *Cryptococcus neoformans* virulence. *Scientific Reports*, 8.

Bulmer G. S. & Sans M. D. (1967). *Cryptococcus neoformans* II. Phagocytosis by Human Leokocytes. *Journal of Bacteriology*, 94(5), 1480-1483.

Burtner C. R., Murakami C. J., Kennedy B. K. & Kaeberlein M. (2009). A molecular mechanism of chronological aging in yeast. *Cell Cycle*, 8(8), 1256-1270.

Carthew R. W. & Sontheimer E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136, 642-655.

Casadevall A., Steenbergen J. N. & Nosanchuky J. D. (2003). 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi - the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 332-337.

Charlier C., Nielsen K., Daou S., Brigitte M., Chretien F. & Dromer F. (2009). Evidence of a Role for Monocytes in Dissemination and Brain Invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 77(1), 120-127.

Chen L., Goldman D. L., Doering T. L. Pirofski L. & Casadevall A. (1999). Antibody Response to *Cryptococcus neoformans* Proteins in Rodents and Humans. *Infection and Immunity*, 67(5), 2218-2224.

Chen S., Sorrell T., Nimmo G., Speed B., Currie B., Ellis D., Marriott D., Pfeiffer T., Parr D. & Byth K. (2000). Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. *Clinical Infectious Diseases*, 31(2), 499-508.

Christianson J. C., Engber W. & Andes D. (2003). Primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent and immunocompromised hosts. *Medical Mycology*, 41(3), 177-188.

Collins H. L. & Bancroft G. J. (1991). Encapsulation of *Cryptococcus neoformans* impairs antigen-specific T-cell responses. *Infection and Immunity*, 59, 3883-3888.

Cox G. M., Mukherjee J., Cole G. T., Casadevall A. & Perfect J. R. (2000). Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. *Infection and Immunity*, 68(2), 443-448.

Cross C. E. & Bancroft G. J. (1995). Ingestion of Acapsular *Cryptococcus neoformans* Occurs via Mannose and b-Glucan Receptors, Resulting in Cytokine Production and Increased Phagocytosis of the Encapsulated Form. *Infection and Immunity*, 63(7), 2604-2611.

Daniels D. S., Mol C. D., Arvai A. S., Kanugula S., Pegg A. E. & Tainer J. A. (2000). Active and alkylated human AGT structures: a novel zinc site, inhibitor and extrahelical base bingind. *The EMBO Journal*, 19(7), 1719-1730.

Diamond R. D. & Bennett J. E. (1973). Growth of *Cryptococcus neoformans* within human macrophages in vitro. *Infection and Immunity*, 7(2), 231-236.

Doering T. L. (2000). How does *Cryptococcus* get its coat? *Trends in Microbiology*, 8(12), 547-553.

Feldmesser M., Kress Y. & Casadevall A. (1998). Effect of antibody to capsular polysaccharide on eosinophilic pneumonia in murine infection with *Cryptococcus neoformans*. *International Journal of Infectious Diseases*, 177(6), 1639-1646.

Feldmesser M., Kress Y., Novikoff P. & Casadevall A. (2000). *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infection and Immunity*, 68(7), 4225-4237.

Feretzaki M., Hardison S. E., Wormley F. L. Jr. & Heitman J. (2014). *Cryptococcus neoformans* Hyperfilamentous Strain Is Hypervirulent in a Murine Model of Cryptococcal Meningoencephalitis. *PLoS One*, 9(8), e104432.

Fire, A. et al. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-811.

Franzot S. P., Salkin I. F. & Casadevall A. (1999). *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 838-840.

Fraser J. A., Subaran R. L., Nichols C. B. & Heitman J. (2003). Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. *Eukaryotic Cell*, 2(5), 1036-1045.

Fromtling R. A., Shadomy H. J. & Jacobson E. S. (1982). Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, 79(1), 23-29.

Fu J., Mares C., Lizcano A., Liu Y. & Wickes B. L. (2011). Insertional mutagenesis combined with an inducible filamentation phenotype reveals a conserved STE50 homologue in *Cryptococcus neoformans* that is required for monokaryotic fruiting and sexual reproduction. *Molecular Microbiology*, 79(4), 990-1007.

Gómez B. L. & Nosanchuk J. D. (2003). Melanin and fungi. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16(2), 91-96.

Granger D. L., Perfect J. R. & Durack D. T. (1985). Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *The Journal of Clinical Investigation*, 76(2), 508-516.

Hannon G. J. (2002). RNA interference. *Nature*, 418, 244-251.

Heiss C., Klutts J. S., Wang Z., Doering T. L. & Azadia P. (2009). The structure of *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan contains β-D-glucuronic acid. Carbohydrate Research, 344(7), 915-920.

Heung L. J. (2017). Innate Immune Responses to *Cryptococcus*. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 3(3), 35.

Hoang L. M. N., Maguire J. A., Doyle P., Fyfe M., Roscoe D. L. (2004). *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997–2002): epidemiology, microbiology and histopathology. *Journal of Medical Microbiology,* 53, 935-940.

Hoffman C. S. & Winston F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57(2-3), 267-272.

Holliday R. & Pugh J. E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 187, 226-232.

Holliday R. (2006). Epigenetics: A Historical Overview. *Epigenetics*, 1(2), 76-80.

Hsueh Y., Fraser J. A. & Heitman J. (2008). Transitions in Sexuality: Recapitulation of an Ancestral Tri- and Tetrapolar Mating System in *Cryptococcus neoformans. Eukaryotic Cell*, 7(10), 1847-1855.

Hu G. & Kronstad J. W. (2010). A Putative P-Type ATPase, Apt1, Is Involved in Stress Tolerance and Virulence in *Cryptococcus neoformans. Eukaryot Cell*, 9(1), 74-83.

Huff J. T. & Zilberman D. (2014). Dnmt1-independent CG methylation contributes to nucleosome positioning in diverse eukaryotes. *Cell*, 156(6), 1286-1297.

Hull C. M. & Heitman J. (2002). Genetics of *Cryptococcus neoformans. Annual Review of Genetics,* 36, 557-615.

Jablonka E. & Lamb M. J. (2002). The Changing Concept of Epigenetics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 981, 82-96.

Jacobson E. S. & Tinnel S. B. (1993). Antioxidant function of fungal melanin. *Journal of Bacteriology*, 175(21), 7102-7104.

Karran P. (2001). Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis*, 22(12), 1931-1937.

Kat A., Thilly W. G., Fang W. H., Longley M. J., Li G. M. & Modrich P. (1993). An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(14), 6424-6428.

Kennedy C. L. & O'Bryan M.K. (2006). N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) mutagenesis and male fertility research. *Human Reproduction Update*, 12(3), 293-301.

Kerkering T. M., Duma R. J. & Shadomy S. (1981). The evolution of pulmonary cryptococcosis: clinical implications from a study of 41 patients with and without compromising host factors. *Annals of Internal Medicine*, 94(5), 611-616.

Kim M. S., Kim S. Y., Yoon J. K., Lee Y. W. & Bahn Y. S. (2009). An efficient gene-disruption method in *Cryptococcus neoformans* by double-joint PCR with NAT-split markers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(3), 983-988.

Kouzarides T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4), 693-705.

Kronstad J. W., Attarian R., Cadieux B., Choi J., D'Souza C. A., Griffiths E. J., Geddes J. M. H., Hu G., Jung W. H., Kretschmer M., Saikia S. & Wang J. (2011). Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* species break out of the opportunistic box. *Nature Review Microbiology*, 9(3), 193-203.

Kwon-Chung J. K., Boekhout T., Fell J. W. & Diaz M. (2002). Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. basillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon*, 51, 804-806.

Kwon-Chung K. J. (1975). A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, 67, 1197-1200.

Kwon-Chung K. J. (1976). A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia*, 68, 943-946.

Kwon-Chung K. J., Edman J. C. & Wickes B. L. (1992a). Genetic association of mating types and virulence on *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 60(2), 602-605.

Kwon-Chung K. J., et al. (2017). The Case of Adopting the "Species Complex" Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Clinical Science and Epidemiology*, 2(1), 357-416.

Kwon-Chung, K. J. & Bennett, J. E. (1992b). *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Feibiger. 866p.

Latypov V. F., Tubbs J. L., Watson A. J., Marriott A. S., McGown G., Thorncroft M., Wilkinson O. J., Senthong P., Butt A., Arvai A. S., Millington C. L., Povey A. C., Williams D. M., Santibanez-Koref M. F., Tainer J. A. & Margison G. P. (2012). Atl1 regulates choice between global genome and transcriptioncoupled repair of O^6-alkylguanines. *Molecular Cell*, 47(1), 50-60.

Lawley P. D. & Martin C. N. (1975). Molecular mechanisms in alkylation mutagenesis. Induced reversion of bacteriophage T4rII AP72 by ethyl methanesulphonate in relation to extent and mode of ethylation of purines in bacteriophage deoxyribonucleic acid. *Biochemical Journal*, 145(1), 85-91.

Lengeler K. B., Fox D. S., Fraser J. A. Allen A., Forrester K., Dietrich F. S. & Heitman J. (2002). Mating-Type Locus of *Cryptococcus neoformans*: a Step in the Evolution of Sex Chromosomes. *Eukaryotic Cell*, 1(5), 704-718.

Lindahl T., Sedgwick B., Sekiguchi M. & Nakabeppu Y. (1988). Regulation and Expression of the Adaptive Response to Alkylating Agents. *Annual Review of Biochemistry*, 57, 133-157.

Litvintseva A. P., Thakur R., Reller L. B. & Mitchell T. G. (2005). Prevalence of Clinical Isolates of *Cryptococcus gattii* Serotype C among Patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. *International Journal of Infectious Disease*, 192(5), 888-892.

Lundin C., North M., Erixon K., Walters K., Jenssen D., Goldman A. S. H. & Helleday T. (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable *in vivo* DNA double-strand breaks. *Nucleic Acid Research*, 33(12), 3799-3811.

Mada P. K. & Alam M. (2017). *Cryptococcus* (Cryptococcosis). *StatPearls Publishing*.

Maeng S., Ko Y., Kim G., Jung K., Floyd A., Heitman J. & Bahn Y. (2010). Comparative Transcriptome Analysis Reveals Novel Roles of the Rasand Cyclic AMP Signaling Pathways in Environmental Stress Response and Antifungal Drug Sensitivity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 9(3), 360-378.

Margison G. P., Butt A., Pearson S. J., Wharton S., Watson A. J., Marriott A., Caetano C. M., Hollins J. J., Rukazenkova N., Begum G. & Santibanez-Koref M. F. (2007). Alkyltransferase-like proteins. *DNA Repair*, 6, 1222-1228.

Margison G. P., Povey A. C., Kaina B. & Santibanez-Koref M. F. (2003). Variability and regulation of O^6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*, 24, 625-635.

Martinez L. R., Garcia-Rivera J. & Casadevall A. (2001). *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotype D) Strains Are More Susceptible to Heat than *C. neoformans* var. *grubii* (Serotype A) Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3365-3367.

May R. C., Stone N. R. H., Wiesner D. L., Bicanic T. & Nielsen K. (2016). *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 14(2), 106-117.

McCarthy T. V. & Lindahl T. (1985). Methyl phosphotriesters in alkylated DNA are repaired by the Ada regulatory protein of *E. coli*. *Nucleic Acids Research*, 13(8), 2683-2698.

Mehta J. M., Ludlum D. B., Renard A. & Verly W.G. (1981). Repair of 06-ethylguanine in DNA by a chromatin fraction from rat liver: transfer of the ethyl group to an acceptor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78, 6766-6770.

Mohd-Yusoff N. F., Ruperao P., Tomoyoshi N. E., Edwards D., Gresshoff P. M., Biswas B. & Batley J. (2015). Scanning the Effects of Ethyl Methanesulfonate on the Whole Genome of *Lotus japonicus* Using Second-Generation Sequencing Analysis. *G3*, 5(4), 559-567.

Monari C., Bistoni F. & Vecchiarelli A. (2006). Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties. *FEMS Yeast Research*, 6(4), 537-542.

Monari C., Bistoni F., Casadevall A., Pericolini E., Pietrella D., Kozel T. R. & Vecchiarelli A. (2005). Glucuronoxylomannan, a microbial compound, regulates expression of co-stimulatory molecules and production of cytokines in macrophages. *The Journal of Infectious Deseases*, 191(1), 127-137.

Moore M. H., Gulbis J. M., Dodson E. J., Demple B. & Moody P. C. (1994). Crystal structure of a suicidal DNA repair protein: the Ada O6-methylguanine-DNA methyltransferase from *E. coli*. *The EMBO Journal*, 13, 1495-1501.

Moyrand F., Fontaine T. & Janbon G. (2007). Systematic capsule gene disruption reveals the central role of galactose metabolism on *Cryptoccocus neoformans* virulence. *Molecular Microbiology*, 64(3), 771-781.

Mylonakis E., Moreno R., El Khoury J. B., Idnurm A., Heitman J., Calderwood S. B., Ausubel F. M. & Diener A. (2005). *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Cryptococcus neoformans* Pathogenesis. *Infection and Immunity*, 73(7), 3842-3850.

Ni M., Feretzaki M., Li W., Floyd-Averette A., Mieczkowski P., Dietrich F. S. & Heitman J. (2013). Unisexual and Heterosexual Meiotic Reproduction Generate Aneuploidy and Phenotypic Diversity *De Novo* in the Yeast *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biology*, 11(9), e1001653.

Nichols C. B., Fraser J. A. & Heitman J. (2004). PAK Kinases Ste20 and Pak1 Govern Cell Polarity at Different Stages of Mating in *Cryptococcus neoformans. Molecular Biology of the Cell*, 15, 4476-4489.

Nishikawa M. M., Lazera M. S., Barbosa G. G., Trilles L., Balassiano B. R., Macedo R. C., Bezerra C. C., Pérez M. A., Cardarelli P. & Wanke B. (2003). Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 73-77.

Nosanchuk J. D. & Casadevall A. (2006). Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(11), 3519-3528.

Noveroske J. K., Weber J. S. & Justice M. J. (2000). The mutagenic action of N-ethyl-N-nitrosourea in the mouse. Mammalian Genome 11, 478-483.

O'Hanlon K. A., Margison G. P., Hatch A., Fitzpatrick D. A., Owens R. A., Doyle S. & Jones G. W. (2012). Molecular characterization of an adaptive response to alkylating agents in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nucleic Acids Research*, 40(16), 7806-7820.

Odom A., Muir S., Lim E., Toffaletti D. L., Perfect J. & Heitman J. (1997). Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans. The EMBO Journal*, 16(10), 2576-2589.

Osterholzer J. J., Surana R., Milam J. E., Montano G. T., Chen G., Sonstein J., Curtis J. L., Huffnagle G. B., Toews G. B. & Olszewski M. A. (2009). Cryptococcal Urease Promotes the Accumulation of Immature Dendritic Cells and a Non-Protective T2 Immune Response within the Lung. *American Journal of Pathology*, 174(3), 932-943.

Park B. J., Wannemuehler K. A., Marston B. J., Govender N., Pappas P. G. & Chiller T. M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*, 23(4), 525-530.

Paul S., Doering T. L. & Moye-Rowley W. S. (2015). *Cryptococcus neoformans* Yap1 is required for normal fluconazole and oxidative stress resistance. *Fungal Genetics and Biology*, 74, 1-9.

Pearson S. J., Ferguson J., Santibanez-Koref M. & Margison G. P. (2005). Inhibition of O^6-methylguanine-DNA methyltransferase by an alkyltransferase-like protein from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 33(12), 3837-3844.

Pearson S. J., Wharton S., Watson A. J., Begum G., Butt A., Glynn N., Williams D. M., Shibata T., Santibanez-Koref M. F. & Margison G. P. (2006). A novel DNA damage recognition protein in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Research*, 34, 2347-2354.

Pegg A. E. (2000). Repair of O^6-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutation Research*, 462, 83-100.

Pegg A. E., Wiest L., Foote R.S., Mitra S. & Perry W. (1983). Purification and properties of 06-methylguanine-DNA transmethylase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 2327-2333.

Perfect J. R. & Casadevall A. (2002). Cryptococcosis. *Infect Disease Clinical of North America*, 16(4), 837-874.

Perfect J. R. (2006). *Cryptococcus neoformans:* the yeast that likes it hot. *FEMS Yeast Research*, 6(4), 463-468.

Pericolini E., Gabrielli E., Cenci E., De Jesus M., Bistoni F., Casadevall A. & Vecchiarelli A. (2009). Involvement of glycoreceptors in galactoxylomannan-induced T cell death. Journal of Immunology, 182(10), 6003-6010.

Popp R. A., Bailiff E. G., Skow L. C., Johnson F. M. & Lewis S. E. (1983). Analysis of a mouse a-globin gene mutation induced by ethylnitrosourea. *Genetics*, 105, 157-167.

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. (2017). Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infectious Diseases*.

Riggs A. D. (1975). X inactivation, differentiation and DNA methylation. *Cytogenet.Cell Genet*, 14, 9-25.

Sassanfar M. & Samson L. (1990). Identification and Preliminary Characterization of an O^6-Methylguanine DNA Repair Methyltransferase in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(1), 20-25.

Singer B. & Grunberger D. *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*. New York: Plenum Press; 1983.

Singh A., Panting R. J., Varma A., Saijo T., Waldron K. J., Jong A., Ngamskulrungroj P., Chan Y. C., Rutherford J. C. & Kwon-Chung K. J. (2013). Factors Required for Activation of Urease as a Virulence Determinant in *Cryptococcus neoformans. mBio*, 4(3), 220-313.

Small J. M. & Mitchell T. G. (1989). Strain variation in antiphagocytic activity of capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* serotype A. *Infection and Immunity*, 57(12), 3751-3756.

Srikanta D., Santiago-Tirado F. H. & Doering T. L. (2014). *Cryptococcus neoformans*: Historical curiosity to modern pathogen. *Yeast*, 31(2), 47-60.

Sukroongreung S., Kitiniyom K., Nilakul C. & Tantimavanich S. (1998). Pathogenicity of basidiospores of *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans*. *Medical Mycology*, 36, 419-424.

Takagi Y., Takahashi M., Sanada M., Ito R., Yamaizumi M. & Sekiguchi M. (2003). Roles of MGMT and MLH1 proteins in alkylation-induced apoptosis and mutagenesis. *DNA Repair (Amst)*, 2(10), 1135-1146.

Toffaletti D. L., Rude T. H., Johnston S. A., Durack D. T. & Perfect J. R. (1993). Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *Journal of Bacteriology*, 175(5), 1405-1411.

Torres-Guerrerro H. & Edman J. C. (1994). Melanin-deficient mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 32, 303-313.

Tripathi K., Mor V., Bairwa N. K., Poeta M. D. & Mohanty B. K. (2012). Hydroxyurea treatment inhibits proliferation of *Cryptococcus neoformans* in mice. *Frontiers in Microbiology*, 3, 187.

Tscharke R. L., Lazera M., Chang Y. C., Wickes B. L. & Kwon-Chung K. J. (2003). Haploid fruiting in Cryptococcus neoformans is not mating type alpha-specific. *Fungal Genetics and Biology*, 39(3), 230-237.

Tubbs J. L. & Tainer J. A. (2010). Alkyltransferase-like proteins: Molecular switches between DNA repair pathways. *Cellular and Molecular Life Science*, 67(22), 3749-3762.

Tubbs J. L., Latypov V., Kanugula S., Butt A., Melikishvili M., Kraehenbuehl R., Fleck O., Marriott A., Watson A. J., Verbeek B., McGown G., Thorncroft M., Santibanez-Koref M. F., Millington C., Arvai A. S., Kroeger M. D., Peterson L. A., Williams D. M., Fried M. G., Margison G. P., Pegg A. E. & Tainer J. A. (2009). Alkylated DNA damage flipping bridges base and nucleotide excision repair. *Nature*, 459(7248): 808-813.

Tubbs J. L., Pegg A. E. & Tainer J. A. (2007). DNA binding, nucleotide flipping, and the helix-turn-helix motif in base repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its implications for cancer chemotherapy. *DNA Repair (Amst)*, 6(8), 1100-1115.

Tucker S. C. & Casadevall A. (2002). Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(5), 3165-3170.

Vallabhaneni S., Mody R. K., Walker T. & Chiller T. (2015). The Global Burden of Fungal Diseases. *Infect Disease Clinical of North America*, 30, 1-11.

Vartivarian S. E., Anaissie E. J., Cowart R. E., Sprigg H. A., Tingler M. J. & Jacobson E. S. (1993). Regulation of cryprococcal capsular polysaccharide by iron. *International Journal of Infectious Diseases*, 167(1), 186-190.

Vecchiarelli A., Retini C., Monari C., Tascini C., Bistoni F. & Kozel T. R. (1996). Purified capsular polysaccharide of *Cryptoccocus neoformans* induces interleukin-10 secretion by human monocytes. *Infection and Immunity*, 64(7), 2846-2849.

Verma S. & Idnurm A. (2013). The Uve1 Endonuclease Is Regulated by the White Collar Complex to Protect *Cryptococcus neoformans* from UV Damage. *PLoS Genetics*, 9(9), e1003769.

Villena S. N., Pinheiro R. O., Pinheiro C. S., Nunes M. P., Takiya C. M., DosReis G. A., Previato J. O., Mendonça-Previato L. & Freire-de-Lima C. G. (2008). Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptoccocus*

neoformans induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. *Cellular Microbiology*, 10(6), 1274-1285.

Vu K., Bautos J. M. & Gelli A. (2015). The Cch1-Mid1 High-Affinity Calcium Channel Contributes to the Virulence of *Cryptococcus neoformans* by Mitigating Oxidative Stress. *Eukaryotic Cell*, 14(11), 1135-1143.

Walton F. J., Idnurm A. & Heitman J. (2005). Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 57(5), 1381-1396.

Wang X., Hsueh Y-P., Li W., Floyd A., Skalsky R. & Heitman J. (2010). Sex-induced silencing defends the genome of *Cryptococcus neoformans* via RNAi. *Genes & Development*, 24, 2566-2582.

Wang Y., Aisen P. & Casadevall A. (1995). *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infection and Immunity*, 63(8), 3131-3136.

Wang, Y. & Casadevall A. (1994). Growth of *Cryptococcus neoformans* in the presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 2646-2650.

Wasko B. M., Carr D. T., Tung H., Doan H., Schurman N., Neault J. R., Feng J., Lee J., Zipkin B., Mouser J., Oudanonh E., Nguyen T., Stetina T., Shemorry A., Lemma M., Kaeberlein M. (2013). Buffering the pH of the culture medium does not extend yeast replicative lifespan. *F1000 Research*, 2, 216.

Wickes B. L., Mayorga M. E., Edman U. & Edman J. C. (1996). Dimorphism and haploid fruiting in Cryptococcus neoformans: association with the alpha-mating type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 93, 7327-7331.

Xie J. L., Polvi E. J., Shekhar-Guturja T. & Cowen L. E. (2014). Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. *Future Microbiology*, 9(4), 523-542.

Xiao W., Derfier B., Chen J. & Samson L. (1991). Primary sequence and biological functions of a *Saccharomyces cerevisiae* 06-methylguanine/04-methylthymine DNA repair methyltransferase gene. *The EMBO Journal*, 10(8), 2179-2186.

York S. J. & Modrich P. J. (2006). Mismatch repair-dependent iterative excision at irreparable O6-methylguanine lesions in human nuclear extracts. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(32), 22674-22683.

Zhang P., Zhang D., Zhao X., Wei D., Wang Y. & Zhu X. (2016). Effects of CTR4 deletion on virulence and stress response in *Cryptococcus neoformans. Antonie van Leeuwenhoek*, 109(8), 1081-1090.