

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas

**Caracterização estrutural, funcional e análise de inibição do sistema tioredoxina
redutase (Trr1) – tioredoxina (Trx1) do fungo patogênico humano *Cryptococcus*
*neoformans***

Claudia Patricia Bravo Chaucanés

Brasília
2018



Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

CLAUDIA PATRICIA BRAVO CHAUCANÉS

Caracterização estrutural, funcional e análise de inibição do sistema tioredoxina redutase (Trr1) – tioredoxina (Trx1) do fungo patogênico humano *Cryptococcus neoformans*

Tese de doutorado desenvolvida no Laboratório de Biofísica da UnB e apresentada ao programa de doutorado em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Orientador (a)

Profa. Dra. Maria Sueli Soares Felipe

Coorientador

Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa

Brasília, fevereiro 2018

Agradecimentos

A Deus, que está sempre iluminando minha vida e de forma singular me conduziu até aqui.

À Professora Doutora Maria Sueli Soares Felipe, pelo exemplo de liderança e perseverança. Obrigada pela orientação e oportunidade, por me receber como aluna de mestrado e doutorado no seu laboratório e pelo crescimento pessoal e profissional.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. João Alexandre Barbosa pelo incentivo e ajuda que sempre me tem dado. Por me permitir utilizar o laboratório de biofísica e me receber no grupo de pesquisa. Agradeço por toda paciência, respeito, confiança, conselhos e amizade.

À Prof. Dra. Larissa Fernandes, pela disponibilidade para me ensinar toda a base sobre os estudos funcionais dos genes. Seus ensinamentos foram muitos e certamente contribuíram positivamente para a minha formação.

Aos meus Pais (Jairo e Cecília), minha vida, a quem devo grande parte de minhas conquistas. Pelo exemplo de dedicação e esperança, pelo carinho, apoio, amor e, pelos momentos que não estivemos juntos e souberam entender. E minha avó (Abuelita Coral), pelo exemplo de vida e luta.

Em especial ao meu namorado Fernando, minha família no Brasil, por todo o incentivo, companheirismo e, sobretudo, pelo amor e apoio em momentos difíceis.

Aos professores, Dra. Sônia Maria de Freitas e Dr. Napoleão Valadares por me aceitar no seu grupo de pesquisa. Pelo auxílio e por me permitir utilizar os equipamentos do laboratório. Agradeço o apoio, o incentivo e, a oportunidade de aprender com pessoas admiráveis.

Aos meus colaboradores Profª. Dra. Ana Abadio, à Dra. Amanda Souza, aos meus colegas Jônatas Cunha Barbosa e Karina Simon, que contribuíram para o desenvolvimento do trabalho auxiliando com sugestões e experimentos. À Prof. Dra. Anamélia Lorenzetti, por me permitir utilizar o laboratório de Imunologia e me disponibilizar os camundongos para os testes *in vivo*.

A todos os companheiros da Biofísica, especialmente aos colegas do laboratório pela ótima convivência, conversas e companhia durante tanto tempo no 'lab'. Ao "Chiquinho" pela amabilidade e pela ajuda sempre manifestada.

Agradeço aos membros da banca examinadora, pelo interesse e disponibilidade. À Pós-Graduação em Patologia Molecular pela oportunidade e suporte. Aos professores e colegas do bloco J e K sempre atenciosos, simpáticos e com boa vontade em me ajudar.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPDF, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização da pesquisa. Ao Brasil, por ter me acolhido com amabilidade. OBRIGADA POR TUDO.

Lista de abreviaturas, e siglas

Å	Ångstrom
AADP+	3-aminopiridina adenina dinucleotídeo fosfato
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Amp	Ampicilina
AMP	Adenosina monofosfato
ART	Terapia antirretroviral
<i>AtTrxR</i>	Tioredoxina redutase de <i>A. thaliana</i>
bp	Pares de bases
BSA	Albumina de soro bovino
BCS	<i>Bathocuproinedisulfonic acid</i>
°C	Grau Celsius
CIM	Concentração inibitória mínima
CFS	Fator Estimulante de Colônias
<i>CaTrr1</i> ou <i>CaTrxR</i>	Tioredoxina redutase 1 de <i>C. albicans</i>
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CLSI	<i>Clinical laboratory Standards Institute</i>
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans (Cn)</i>
<i>CnTrr1</i> ou <i>CnTrxR</i>	Tioredoxina redutase recombinante 1 de <i>C. neoformans</i>
<i>CnTrx1</i>	Tioredoxina recombinante 1 de <i>C. neoformans</i>
Cam	Cloranfenicol
CSS	Pontuação de significância de complexação
CO ₂	Gás Carbônico
C-terminal	Extremidade carboxi-terminal
DH5α	Linhagem de <i>Escherichia coli</i>
ΔG	Varição da energia livre de Gibbs [J.mol ⁻¹]
ΔH	Varição de entalpia [J.mol ⁻¹]
ΔS	Varição de entropia [J.mol ⁻¹]
DC	Dicroísmo circular
DM	Dinâmica molecular
DMSO	Dimetilsulfoxido
DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzólico
<i>EcTrxR</i>	Tioredoxina redutase de <i>E. coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos de América
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FMN	Mononucleotídeo de flavina
5FC	5-fluorocitosina
h	Hora
<i>hTrxR</i> ou <i>hTrr</i>	Tioredoxina redutase humana
His Tag	Cauda de histidinas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana adquirida
HPH	Gene de resistência a Hygromicina B
HTS	<i>High-throughput screening</i> (varredura <i>High-throughput</i>)
H-TrxR ou H-Trr	Isoforma de alta massa molecular da Tioredoxina redutase
Hyg	Hygromicina B
IC ₅₀	Concentração do agente competidor na qual se obtém 50% de inibição da ligação
IEP	Ponto isoelétrico
IFIs	Infecções fúngicas invasivas
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
FO	Conformação oxidada da proteína
FR	Conformação reduzida da proteína
K	kelvin
kDa	Kilo Dalton

K _m	Constante de Michaelis-Menten
LB	Meio Luria-Bertani
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
L-TrxR ou L-Trr	Isoforma de baixa massa molecular da Tioredoxina redutase
M	Molar
Mb	Megabases
mCherry	Proteína fluorescente
MFC	Concentração fungicida mínima
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-N-Morpholino propanesulfônico
MR	Substituição molecular
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-reduzido
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidado
NAT	Nourseotricina
N-terminal	Extremidade amino terminal
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ORF	Fase de Leitura Aberta
phRMA	<i>Pharmaceutical Research and Manufacturers of America</i>
p/v	Peso por volume
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
P _{CTR4-2}	Promotor induzível de um transportador de cobre
Pisa	<i>Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
R	Constante dos gases [J.mol ⁻¹]
RMS	<i>Root Mean Square Deviation</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotação por minuto
RPMI	RPMI-1640 sem bicarbonato, com L-glutamina
ScTrxR1 ou ScTrr1	Tioredoxina redutase 1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
sec	Segundos
SNC	Sistema nervoso central
ST1	Solução de trabalho 1
T	Temperatura absoluta [K]
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
TRR1 ou TRR	Gene tioedoxina redutase 1
TRX1	Gene tioedoxina 1
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UV	Ultravioleta
vol/vol	Volume por volume
V _{máx}	Velocidade máxima
VS	<i>Virtual screening</i> (varredura virtual)
W	Watts
× g	Gravidade
YPD	<i>Yeast peptone dextrose</i>
µm	Micrometro
µM	Micromolar

SUMÁRIO	
RESUMO	XIV
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Infecções fúngicas	18
1.2 Fungos patogênicos	18
1.3 Doenças humanas causadas por fungos patogênicos	19
1.4 Criptococose	20
1.4.1 <i>Cryptococcus neoformans</i>	22
1.4.2 Resistência de <i>Cryptococcus</i>	22
1.5 Principais determinantes da virulência	23
1.5.1 Cápsula	23
1.5.2 Melanina	24
1.5.3 Habilidade de crescimento à temperatura fisiológica do hospedeiro mamífero	24
1.6 A evolução de estratégias terapêuticas antifúngicas	25
1.7 Mecanismos de resistência a antifúngicos	27
1.8 Busca de potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas	28
1.9 <i>CnTrr1</i> como alvo molecular para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas	31
1.10 Viabilidade celular do alvo <i>Trr1</i> e o seu substrato	35
2. JUSTIFICATIVA	37
CAPÍTULO I	39
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	
1. OBJETIVO GERAL	40
1.1 Objetivos específicos	40
2. TIOREDOXINA	41
TITLE: CRYSTAL STRUCTURE OF THIOREDOXIN 1 ENZYME FROM <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> AT 1.8 Å RESOLUTION	42
3. TIOREDOXINA REDUTASE (<i>Trr</i>)	64
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS	66
3.1.2 Síntese química do gene <i>TRR1</i> para expressão heteróloga	66
3.1.3 Transformação de cepas de <i>Escherichia coli</i>	66
3.1.4 Expressão e purificação da proteína recombinante <i>Trr1</i> de <i>C. neoformans</i>	66
3.1.5 Cromatografia por afinidade a íons imobilizados (IMAC)	67
3.1.6 Cromatografia de exclusão molecular (SEC)	67
3.1.7 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) da proteína <i>CnTrr1</i>	68
3.1.8 Determinação da concentração proteica	68
3.1.9 Análise da estrutura terciária da proteína <i>CnTrr1</i> por espectrofluorimetria	68
3.1.10 Análise da estrutura secundária da proteína <i>CnTrr1</i> por dicroísmo circular	69
3.1.11 Ensaio de termoestabilidade da proteína <i>CnTrr1</i> por dicroísmo circular	69

3.1.12	<i>Cristalização da proteína recombinante CnTrr1</i>	70
3.1.13	<i>Coleta de dados de difração e determinação das fases</i>	71
3.1.14	<i>Refinamento e validação da estrutura cristalográfica de CnTrr1</i>	71
3.1.15	<i>Testes in silico</i>	72
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.2.1	<i>Cromatografia de afinidade da proteína recombinante CnTrr1</i>	77
3.2.2	<i>Espalhamento dinâmico de luz (DLS) da proteína recombinante CnTrr1</i>	77
3.2.3	<i>Cromatografia de exclusão molecular da proteína recombinante CnTrr1</i>	77
3.2.4	<i>Espectros de CnTrr1 em diferentes pHs e na presença de NADPH</i>	78
3.2.5	<i>Dicroísmo circular</i>	85
3.2.6	<i>Estrutura secundária da CnTrr1 em função da temperatura</i>	85
3.2.7	<i>Parâmetros termodinâmicos</i>	88
3.2.8	<i>Espectros Far-UV de CnTrr1 a 25 °C, complexada ao NADPH em função do pH</i>	89
3.2.9	<i>Cristalização e refinamento da proteína recombinante Trr1 em C. neoformans</i>	91
3.2.10	<i>Coleta de dados e difração de raios X</i>	92
3.2.11	<i>Substituição molecular e refinamento</i>	93
3.2.12	<i>Estrutura geral da proteína recombinante CnTrr1</i>	95
3.2.13	<i>Sítio ativo</i>	98
3.2.14	<i>CnTrr1 uma flavoproteína dimérica</i>	101
3.2.15	<i>Ligação ao FAD</i>	102
3.2.16	<i>Comparação de CnTrr1 com Trr de baixa massa molecular (L-Trr)</i>	103
3.2.17	<i>Resíduos conservados nas Trr</i>	105
3.2.18	<i>Modelo da Trr1 na conformação reduzida</i>	106
3.2.19	<i>Mudança conformacional do modelo reduzido (FR)</i>	110
3.2.20	<i>Complexo Trr1-Trx1 de C. neoformans por docking</i>	111
3.2.21	<i>Simulação de docking com os ligantes</i>	114
4.	CONCLUSÕES CAPÍTULO I	128
	CAPÍTULO II	129
	ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO DAS MOLÉCULAS POTENCIALMENTE INIBIDORAS DO FUNGO PATOGÊNICO C. NEOFORMANS	
1.	OBJETIVO GERAL	130
1.1	<i>Objetivos específicos</i>	130
2.	POTENCIAL ANTIFÚNGICO DAS MOLÉCULAS INIBITÓRIAS	131
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	132
3.1	<i>Ensaio de atividade antifúngica in vitro</i>	132
3.1.1	<i>Inóculo</i>	132
3.1.2	<i>Agentes antifúngicos e procedimento do teste</i>	132

3.1.3 Incubação e leitura	133
3.2 Curvas de crescimento	133
3.3 Ensaio enzimático	133
3.3.1 Inibição enzimática da <i>CnTrr1</i> com os potenciais compostos antifúngicos	135
3.4 Ensaio de citotoxicidade e ensaios <i>in vivo</i>	136
3.4.1 Animais	136
3.4.2 Teste da atividade hemolítica	136
3.4.3 Teste da atividade citotóxica em macrófagos murinos	137
3.4.4 Teste da capacidade microbicida <i>in vivo</i>	137
3.5 Imunocitocalização da proteína Tioredoxina redutase de <i>C. neoformans</i>	138
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	139
4.1 Testes <i>in vitro</i> das drogas selecionadas	139
4.2 Avaliação da inibição de UFC (Unidade Formadora de Colônias)	143
4.3 Efeito das moléculas inibitórias na morfologia das células de <i>C. neoformans</i>	143
4.4 Ensaio de inibição enzimática	146
4.5 Citotoxicidade	150
4.6 Ensaios <i>in vivo</i>	151
4.7 Imunocitocalização da proteína Tioredoxina redutase em <i>C. neoformans</i>	153
5. CONCLUSÕES CAPÍTULO II	155
CAPÍTULO III	156
ESTUDOS FUNCIONAIS DA TIOREDOXINA REDUTASE, UM GENE ESSENCIAL NO FUNGO PATOGÊNICO <i>C. NEOFORMANS</i>	
1. OBJETIVO GERAL	157
1.1 Objetivos específicos	157
2. FUNCIONALIDADE DO GENE ESSENCIAL <i>TRR1</i> EM <i>C. NEOFORMANS</i>	158
3. MATERIAIS E MÉTODOS	159
3.1 Meios de cultura	159
3.2 Construções dos cassetes de DNA e protocolo de transformação genética	159
3.2.1 Construção do cassete Hyg/ P_{CTR4-2}	159
3.2.2 Construção do cassete para inserção do promotor P_{CTR4-2} usando	160
3.2.3 Transformação de <i>C. neoformans</i> por biobalística	163
3.2.4 Extração de DNA genômico de <i>C. neoformans</i> (<i>Smash & Grab</i>)	164
3.2.5 Confirmação P_{CTR4-2} : <i>TRR</i> por PCR	164
3.2.6 Construção do cassete <i>TRR-mCherry</i> usando PCR Double Joint (<i>DJ-PCR</i>)	164

3.2.7	Confirmação da integração do cassete TRR-mCherry por PCR	166
3.2.8	Confirmação da integração do cassete TRR-mCherry-NAT ^R por Southern Blot	167
3.3	Determinação do crescimento celular do mutante condicional P _{CTR4-2} /TRR1	167
3.3.1	Curvas de crescimento	168
3.3.2	Avaliação fenotípica <i>in vitro</i>	168
3.3.3	Determinação da atividade dos agentes antifúngicos	169
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	171
4.1	Confirmação da construção Hyg/P _{CTR4-2} por PCR <i>overlapping</i>	171
4.2	Construção de cassete contendo o gene TRR sobre o controle do promotor induzível P _{CTR4-2} em <i>C. neoformans</i>	171
4.3	Confirmação dos mutantes P _{CTR4} /TRR1	172
4.4	Construção do cassete TRR1-mCherry por PCR <i>Double Joint</i>	173
4.5	Determinação do crescimento celular da cepa P _{CTR4-2} /TRR1	176
4.6	Avaliação da susceptibilidade do mutante P _{CTR4-2} /TRR1 a vários agentes estressores	178
4.7	Produção de Melanina	181
4.8	Efeito de P _{CTR4-2} /TRR1 sobre a expansão da cápsula	182
4.9	Efeito das moléculas inibidores sob o crescimento do P _{CTR4-2} /TRR1	183
4.10	Determinação das curvas de crescimento	184
5.	CONCLUSÕES CAPÍTULO III	190
	PERSPECTIVAS	191
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	192
	ANEXOS	209
Anexo A	– Cristais de CnTrx1 obtidos utilizando os kits de cristalização	209
Anexo B	- Dados obtidos através de DLS das frações provenientes da purificação de CnTrr1	212
Anexo C	- Cristalização da CnTrr1	213
Anexo D	- Teste da atividade citotóxica da molécula 3 em macrófagos murinos	215
Anexo E	- Teste de citotoxicidade e ensaio <i>in vivo</i> utilizando o modelo experimental de <i>Criptococose</i>	216
Anexo F	- Oligonucleotídeos utilizados no estudo de TRR em <i>C. neoformans</i>	219
Anexo G	- Promotor regulado em <i>C. neoformans</i> usando o promotor CTR4	220
Anexo H	- Caracterização funcional de rad53 de <i>Cryptococcus neoformans</i>	221

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência anual de infecção criptocócica.....	21
Figura 2. Agentes antifúngicos e seus alvos.....	26
Figura 3. Cascata do sistema redox da tioredoxina redutase.....	32
Figura 4. Estrutura global do monômero Trr1 de <i>S. cerevisiae</i>	34
Figura 5. Estrutura global do monômero Trx <i>f</i> de cloroplastos de espinafre.....	35

CAPÍTULO I

Manuscript *CnTrx1*

Figure 1. General architecture of Trx1 from <i>C. neoformans</i>	56
Figure 2. Molecular Interface of the crystallographic structure of <i>CnTrx1</i> and superposition of the active site motif from different thioredoxins.....	57
Figure 3. Stereo surface representation of <i>CnTrx1</i> monomer.....	59
Supplementary Figure 1. Purification of recombinant Trx1 from <i>C. neoformans</i>	60
Supplementary Figure 2. Size exclusion chromatography of recombinant <i>CnTrx1</i>	61
Supplementary Figure 3. Enzymatic activity of <i>C. neoformans</i> Trx1.....	62

CnTrr1

Figura 6. Esquema das conformações FO e FR, conforme proposto por Waksman <i>et al.</i> , (1994).....	64
Figura 7. Resumo dos ensaios <i>in silico</i> realizados em Trr1 _{ox} e no modelo Trr1 _{red}	75
Figura 8. Purificação da proteína recombinante Trr1 de <i>C. neoformans</i>	76
Figura 9. Gráfico da cromatografia de exclusão molecular para <i>CnTrr1</i>	77
Figura 10. Espectros de emissão fluorescência da proteína <i>CnTrr1</i> em diferentes pHs.....	78
Figura 11. Atenuação de emissão de fluorescência da proteína <i>CnTrr1</i> na presença de NADPH em concentrações crescentes nos diferentes pHs.....	81
Figura 12. Gráfico de Stern-Volmer para <i>CnTrr1</i> recombinante, usando o NADPH como atenuador a 25 °C.....	83
Figura 13. Interação entre a proteína <i>CnTrr1</i> e o cofator NADPH monitorada pela atenuação de fluorescência.....	84
Figura 14. Espectros dicróicos em região Far-UV (195-260 nm) da <i>CnTrr1</i> obtidos a 25 °C.....	85
Figura 15. Espectros dicróicos em Far-UV na faixa de 195-260 nm da <i>CnTrr1</i> em função do pH e temperatura.....	86
Figura 16. Curvas de desnaturação térmica da <i>CnTrr1</i>	87
Figura 17. Aproximação de van't Hoff de <i>CnTrr1</i> no pH 5,0.....	88
Figura 18. Espectros Far-UV na faixa 195-260 nm da <i>CnTrr1</i> -NADPH em função do pH.....	89
Figura 19. Curvas de desnaturação térmica da <i>CnTrr1</i> -NADPH em pHs 5,0 e 7,0.....	90
Figura 20. Fotomicrografia do crescimento dos cristais da proteína recombinante <i>CnTrr1</i>	91
Figura 22. Fotomicrografia do crescimento dos cristais da proteína recombinante <i>CnTrr1</i> após refinamento.....	92
Figura 23. Alinhamento múltiplo realizado entre a sequência da proteína Trr1 de <i>C. neoformans</i> e as sequências de outras tioredoxinas redutases conhecidas.....	96

Figura 24. Estrutura geral de <i>CnTrr1</i>	98
Figura 25. Sítio ativo da tioredoxina redutase oxidada.....	99
Figura 26. Resíduos ao redor da face do anel isoaloxazina de FAD.....	100
Figura 27. Dímero da enzima <i>CnTrr1</i>	101
Figura 28. Superposição dos monômeros da <i>CnTrr1_{ox}</i> e <i>ScTrxRox</i>	104
Figura 29. Superposição dos monômeros de <i>CnTrr1_{ox}</i> e <i>EcTrxR_{ox}</i>	105
Figura 30. Superposição <i>CnTrr1</i> e <i>EcTrxR</i> , conformação FO e FR.....	108
Figura 31. Desvio médio quadrático (rmsd) do modelo FR da <i>CnTrr1</i> gerado ao longo da DM, em 100 ns.....	108
Figura 32. Exibição do anel de isoaloxazina e parte da cadeia lateral ribitol do FAD em <i>CnTrr1</i> ..	110
Figura 33. Representação esquemática de Trr na conformação FO e FR.....	110
Figura 34. Conformação FO e FR da <i>CnTrr1</i>	111
Figura 35. Superfície molecular de Trr1 FR e FR complexada (FRC).....	112
Figura 36. Modelo do complexo Trr1-Trx1 de <i>C. neoformans</i>	113
Figura 37. Interações entre a proteína Trr1 _{ox} e as moléculas inibidoras.....	116
Figura 38. Docking, possível interação molecular de <i>C. neoformans</i> Trr1 _{ox} com os ligantes.....	116
Figura 39. Docking, possível interação molecular de <i>C. neoformans</i> Trr1 _{ox} com FAD.....	117
Figura 40. Interações entre o modelo reduzido (<i>CnTrr1</i> -FR) e a molécula inibitória 14.....	119
Figura 41. Interações entre o modelo reduzido (<i>CnTrr1</i> -FR) e a molécula inibitória 3.....	120
Figura 42. Interações entre a holoproteína (<i>CnTrr1</i> -FR após DM) e a molécula 14 e 3.....	122
Figura 43. Interações polares pontilhadas em amarelo e a distância em Å com a molécula 14....	126
Figura 44. Interações polares pontilhadas em amarelo e a distância em Å com a molécula 3.....	127

CAPÍTULO II

Figura 45. Representação esquemática da realização do teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> pelo método de microdiluição em caldo.....	133
Figura 46. Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> das moléculas contra o fungo patogênico <i>C. neoformans</i> (H99).....	140
Figura 47. Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> do fluconazol e a anfotericina B no fungo patogênico <i>C. neoformans</i> (H99).....	141
Figura 48. Atividade antifúngica dos compostos sobre <i>C. neoformans</i> : Log UFC/mL.....	143
Figura 49. Efeito das moléculas na replicação de <i>C. neoformans</i>	145
Figura 50. Determinação de K_m e $V_{máx}$ de <i>CnTrr1</i> utilizando o substrato <i>CnTrx1</i>	147
Figura 51. Representação gráfica de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk mostrando o perfil de inibição da enzima tioredoxina redutase recombinante.....	148
Figura 52. Citotoxicidade da molécula 3 por método <i>in vitro</i>	151
Figura 53. Logaritmo do número de UFC/mg encontrado no cérebro e no pulmão dos camundongos infectados via intranasal com a cepa H99.....	152
Figura 54. Imunolocalização de Trr1 em levedura de <i>C. neoformans</i>	153

CAPÍTULO III

Figura 55. Procedimento da construção do cassete Hyg/PCTR4-2.....	160
Figura 56. Esquema representativo da estratégia para construção dos cassetes contendo o Promotor CTR4.....	162

Figura 57. Procedimento geral da técnica PCR <i>Double Joint</i> para construção do cassete TRR-mCherry.....	166
Figura 58. Construção do cassete Hyg/P _{CTR4-2} por PCR.....	171
Figura 59. Confirmação dos produtos obtidos na primeira etapa da técnica de PCR <i>Double Joint</i>	172
Figura 60. Confirmação dos produtos obtidos na segunda etapa da técnica de PCR <i>Double Joint</i>	172
Figura 61. Confirmação da inserção do promotor P _{CTR4} em <i>C. neoformans</i>	173
Figura 62. Confirmação dos produtos obtidos da técnica de PCR <i>Double Joint</i>	174
Figura 63. Confirmação dos transformantes TRR-mCherry_Nat por PCR.....	174
Figura 64. <i>Southern Blot</i> dos transformantes TRR-mCherry confirmados por PCR.....	175
Figura 65. Microscopia de fluorescência utilizando a linhagem TRR1-mCherry em <i>C. neoformans</i>	176
Figura 66. Determinação de crescimento das cepas H99 e P _{CTR4-2} /TRR1 em <i>C. neoformans</i> em ágar YPD contendo BCS e CuSO ₄	177
Figura 67. Determinação de crescimento das cepas H99 e P _{CTR4-2} /TRR1 em <i>C. neoformans</i> em ágar YNB contendo BCS e CuSO ₄ incubadas.....	178
Figura 68. Análise da susceptibilidade ao estresse oxidativo causado por H ₂ O ₂ e menadiona do mutante P _{CTR4-2} /TRR1 de <i>C. neoformans</i> em meio YPD e YNB a 30 °C.....	179
Figura 69. Produção de melanina por P _{CTR4-2} /TRR1 de <i>C. neoformans</i>	181
Figura 70. Avaliação do tamanho da cápsula na cepa mutante PCTR4-2/TRR1.....	182
Figura 71. Determinação de crescimento das cepas H99 e P _{CTR4-2} /TRR1 de <i>C. neoformans</i> em presença das moléculas antifúngicas em ágar YPD.....	184
Figura 72. Curvas de crescimento da cepa selvagem H99 e mutante P _{CTR4-2} /TRR1 de <i>C. neoformans</i> (log UFC/mL).....	185
Figura 73. Curvas de crescimento da atividade inibitória das moléculas 14 e 3 da cepa selvagem H99 e mutante P _{CTR4-2} /TRR1 de <i>C. neoformans</i>	186
Figura 74. Curvas de crescimento das cepas P _{CTR4-2} /TRR1 e H99 crescidas em YPD e YNB contendo BCS (200 µM) e CuSO ₄ (25 µM).....	187
Figura 75. Curvas de crescimento das linhagens mutante P _{CTR4-2} /TRR1 e selvagem H99 em presença das moléculas inibitórias.....	188
ANEXOS	
Anexo A. Cristais de <i>CnTrx1</i> obtidos utilizando os kits de cristalização.....	209
Figura 1S. Fotomicrografia do crescimento dos cristais da proteína recombinante <i>CnTrx1</i>	209
Figura 2S. Fotomicrografia das condições de refinamento da proteína recombinante Trx1 de <i>C. neoformans</i>	211
Anexo C. Cristalização da <i>CnTrr1</i>	213
Figura 21. Fotomicrografia do crescimento dos cristais da proteína recombinante <i>CnTrr1</i>	214

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das principais infecções fúngicas no mundo.....	18
Tabela 2. Antifúngicos e mecanismos mais frequentes de resistência aos medicamentos	27
Tabela 3. Potenciais genes alvo selecionados para desenvolvimento de novas drogas antifúngicas.....	30

CAPÍTULO I

Manuscript *CnTrx1*

Table 1. Data collection and structure refinement statistics.....	54
Supplementary Table 1. Percent sequence identity and Root-mean-square (RMS) values comparisons of thioredoxins structures on 24 subject sequences.....	63

CnTrr1

Tabela 5. Constante de Stern-Vomer (K_{sv}) e constante de dissociação (K_d) do complexo <i>Trr1</i> -NADPH em pHs diferentes.....	83
Tabela 6. Sumário da coleção de dados de difração de raios X de um cristal único de <i>CnTrr1</i>	93
Tabela 7. Estatísticas do refinamento da estrutura de <i>CnTrr1</i>	95
Tabela 8. Interações da <i>CnTrr1</i> com o FAD.....	102
Tabela 9. Afinidade de ligação das melhores poses dos compostos no <i>docking</i> rígido.....	115
Tabela 10. <i>Score</i> das melhores poses dos compostos no <i>docking</i> e simulações de dinâmica molecular na conformação FR de <i>Trr1</i>	118
Tabela 11. Principais resíduos de aminoácidos que formam interações hidrofílicas e hidrofóbicas no <i>docking</i> com os ligantes e <i>CnTrr1</i>	123

CAPÍTULO II

Tabela 12. Atividade antifúngica <i>in vitro</i> das moléculas selecionadas pela varredura virtual.....	142
Tabela 13. Parâmetros cinéticos de inibição da tioredoxina reductase pelas moléculas.....	149

ANEXOS

ANEXO B.

Tabela 4. Dados obtidos através de DLS das frações provenientes da purificação de <i>CnTrr1</i>	212
--	-----

ANEXO F.

Tabela 14. Oligonucleotídeos utilizados no estudo de <i>TRR</i> em <i>C. neoformans</i>	219
--	-----

Resumo

A criptococose é uma infecção fúngica fatal que se constitui em um problema de saúde crescente principalmente em indivíduos imunocomprometidos. As altas taxas de letalidade associadas as infecções por fungos indicam as falhas existentes nas atuais terapias, bem como o arsenal limitado de drogas com potencial antifúngico, sendo que muitas apresentam efeitos colaterais ou tóxicos. Ainda, a complexidade do tratamento pode ser atribuída em sua maior parte ao surgimento de resistência, demonstrando uma necessidade urgente de uma nova geração de agentes antifúngicos efetivos. A identificação de genes conservados essenciais necessários para o crescimento de fungos patogênicos é uma estratégia para a busca de novos alvos. Por genômica comparativa foram identificados genes ortólogos ausentes no genoma humano e presentes em fungos patogênicos humanos, entre estes, a tioredoxina redutase (Trr1), que foi selecionada como um possível candidato para a busca de novas drogas antifúngicas. Trr1 faz parte de um complexo conhecido como sistema tioredoxina, que contém a tioredoxina (Trx), tioredoxina redutase (Trr) e o NADPH. Esta flavoenzima está localizada no citoplasma das células fúngicas e desempenha um papel crítico na manutenção do estado redox de diferentes tipos celulares.

Neste trabalho foram purificadas e cristalizadas as proteínas recombinantes Trr1 e Trx1 de *C. neoformans* e na ausência de estruturas tridimensionais resolvidas para proteínas que participam do sistema tioredoxina em fungos patogênicos, foi determinada a estrutura 3D por cristalografia de raios X destas duas proteínas. As estruturas *CnTrx1* e *CnTrr1* foram resolvidas a 1,8 e 2,25 Å de resolução, respectivamente. Os resultados mostraram que *CnTrx1* é um monômero em solução, estruturalmente tem um dobramento típico contendo o motivo do sítio ativo Cys-Gly-Pro-Cys conservado. Pequenas diferenças estruturais relacionadas com o seu estado oxidado e com regiões conservadas ao redor do local catalítico foram observadas quando comparadas com tioredoxinas de outras espécies. O estudo mostrou apenas mudanças menores entre *CnTrx1* e Trx de *Malassezia sympodialis* usada como modelo. Embora as Trx tenham sido isoladas e caracterizadas em muitos organismos, essa nova estrutura 3D fornece informações importantes para a compreensão estrutural e funcional de Trx em fungos patogênicos humanos. Em relação à *CnTrr1*, a enzima é dimérica em solução, a massa molecular da enzima purificada por cromatografia de filtração em gel, foi estimada em cerca de 75 kDa. Além disso, observou-se que a intensidade de fluorescência da proteína diminui com o aumento da concentração de NADPH, apesar de não ter ocorrido forte deslocamento do centro de massa. Em pHs mais ácidos a enzima apresentou uma maior mudança conformacional. Em adição, os resultados de dicroísmo circular mostraram que as condições alcalinas e neutras não promovem alterações consideráveis da estrutura secundária em comparação com pHs ácidos, e a estabilidade térmica da proteína em diferentes pHs, foi maior em pH 7,0. A análise estrutural de

CnTrr1 mostrou que o monômero é composto por dois domínios que formam os sítios de ligação ao FAD e ao NADPH. A distância de 2,04 Å entre os dois resíduos de cisteína mostra que *CnTrr1* encontra-se na forma oxidada (FO). Como relatado em outros estudos, foi observado que o dissulfeto do sítio ativo está enterrado entre os domínios e não é acessível para o substrato. A comparação de *CnTrr1* com Trr de baixa massa molecular revelou que a enzima fúngica tem *loops* extra na região N- e C-terminal. Adicionalmente, a obtenção do modelo *CnTrr1* na forma reduzida (FR), revelou a mudança conformacional do domínio de NADPH. O modelo na conformação FR após simulação de dinâmica molecular, foi usado para construir o modelo complexado Trr1-Trx1 de *C. neoformans*. Os resultados mostraram que *CnTrx1* interage com os dois domínios na *CnTrr1*, e várias interações parecem ser responsáveis pelo reconhecimento proteína-substrato em fungos.

Já o estudo da atividade antifúngica *in vitro* com moléculas identificadas pela varredura virtual, mostrou que 2 moléculas, nas concentrações de 16 e 64 µg/mL, foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* do fungo *C. neoformans*. Além disso, após o tratamento com essas moléculas, as células de levedura apresentaram alterações morfológicas, devido provavelmente aos defeitos de divisão celular. Embora estas moléculas não apresentaram toxicidade *in vitro*, a administração destas não foi capaz de reduzir a carga fúngica em tecidos dos camundongos (pulmão e cérebro). Em paralelo, foram realizados os ensaios de caracterização e inibição enzimática. Os valores dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ foram 1,344 µM, e 0,003697 µM/s, respectivamente, enquanto que os ensaios de inibição da *CnTrr1* confirmaram que as 2 moléculas foram capazes de inibir especificamente a proteína recombinante Trr1. Visando investigar a interação das moléculas na estrutura 3D de *CnTrr1*, as moléculas inibitórias foram submetidas aos ensaios de *docking*, modelagem e dinâmica molecular. Os resultados mostraram que os compostos têm afinidade de ligação pelo sítio do complexo enzima-substrato mas, também ocuparam o sítio dos cofatores. Finalmente, os estudos funcionais sobre o gene *TRR1* em *C. neoformans*, substituindo o promotor endógeno deste gene, demonstraram que este participa na regulação de alguns dos fenótipos de virulência, e está associado com a resistência a vários agentes causadores de estresse. Já o tratamento com as 2 moléculas mencionadas mostrou ligeiras diferenças na atividade inibitória da proteína Trr1. Os resultados anteriores de *TRR1* evidenciam a essencialidade deste gene no crescimento fúngico *in vitro*, e confirmam a Trr1, como um alvo potencial para pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos contra o fungo patogênico *C. neoformans*.

Palavras chaves: Tioredoxina redutase 1, Tioredoxina 1, *Cryptococcus neoformans*, Moléculas inibitórias, Estrutura cristalográfica.

Abstract

Cryptococcosis is a fatal fungal infection that is a growing health problem, especially in immunocompromised individuals. The high lethality rates associated with fungal infections indicate that there are shortcomings in current therapies, as well as the limited arsenal of antifungal drugs, many of which present collateral or toxic effects. Further, the complexity of the treatment can be mostly attributed to the emergence of resistance, demonstrating an urgent need for a new generation of effective antifungal agents. Identification of conserved essential genes required for the growth of pathogenic fungi is a strategy for finding new targets. Studies comparative genomics identified orthologous genes absent in the human genome and present in human pathogenic fungi, among these, thioredoxin reductase (Trr1) was selected as a possible candidate for the search for new antifungal drugs. Trr1 is part of a thioredoxin complex, which contains thioredoxin (Trx), thioredoxin reductase (Trr1), and NADPH. This flavoenzyme is found in fungal cytoplasm and plays a critical role in maintaining the redox state of different cell types.

In this work, the Trr1 and Trx1 recombinant proteins of *C. neoformans* were purified and crystallized, in the absence of resolved three-dimensional structures for proteins participating in the thioredoxin system in pathogenic fungi, the 3D structure was determined by X-ray crystallography. The *Cn*Trx1 and *Cn*Trr1 structures were resolved at 1.8 and 2.25 Å resolution, respectively. The results showed that *Cn*Trx1 is a monomer in solution, structurally it has a typical folding containing the conserved Cys-Gly-Pro-Cys active site motif. Small structural differences related to their oxidized state and conserved regions around the catalytic site were observed when compared with thioredoxins from other species. The study showed only minor changes between *Cn*Trx1 and *Malassezia sympodialis* Trx used as a search model. Although Trx have been isolated and characterized in many organisms, this new 3D structure provides important information for the structural and functional understanding of Trx in human pathogenic fungi. Regarding *Cn*Trr1, the enzyme is dimeric in solution, the molecular weight of the protein by gel filtration chromatography was estimated to be about 75 kDa. Also, it was observed that the fluorescence intensity of the protein decreases with increasing concentration of NADPH, however, there was no strong displacement of the center of mass. In the more acidic pHs the enzyme presented a greater conformational change. In addition, circular dichroism showed that alkaline and neutral conditions do not promote significant alterations in secondary structure when compared to acidic pH, and the thermal stability of the protein at different pHs was higher at pH 7.0. Structural analysis of *Cn*Trr1 showed that the monomer is composed of two domains that form the FAD/NADPH binding sites. The distance of 2.04 Å between the two Cys residues shows that *Cn*Trr1 is in the oxidized form (FO). As reported in other studies, it has been observed that the active site disulfide is buried

between the domains and is not accessible to the substrate. Comparison of *CnTrr1* with low molecular weight Trr revealed that the fungal enzyme have extra loops in the N- and C-terminal regions. Additionally, obtaining reduced-form model (FR) revealed the conformational change in the NADPH domain. The FR conformation model after molecular dynamics simulation was used to built a simulated model of Trr1-Trx1 complex of *C. neoformans*. The results showed that *CnTrx1* package against both domains in *CnTrr1*, and several interactions appeared to be responsible for protein-substrate recognition in fungi.

On the other hand, evaluation of the *in vitro* antifungal activity with small molecules identified by the virtual screening showed that 2 molecules, at concentrations of 16 and 64 $\mu\text{g/mL}$, were able to inhibit *in vitro* growth of *C. neoformans*. In addition, after treatment with these molecules, yeast cells showed morphological changes probably due to defects in cell replication. Although the molecules were not toxic *in vitro*, the administration of these molecules did not reduce tissue fungal burden in mice infected (lung and brain). In parallel, enzymatic characterization and inhibition tests were performed. The kinetic parameters K_m and V_{max} were 1.344 μM , and 0.003697 $\mu\text{M/s}$, respectively, whereas the inhibition assays of *CnTrr1* confirmed that the 2 molecules are capable of specifically inhibiting the recombinant Trr1 protein. Aiming to investigate the interaction of the molecules in the 3D structure of *CnTrr1*, inhibitory molecules were subjected to docking, modeling and molecular dynamics assays. The results showed that the compounds have binding affinity for the substrate complexation site, but also occupied the site of the cofactors. Finally, functional studies in *C. neoformans* by replacing the endogenous *TRR1* promoter have demonstrated that it participates in the regulation of some virulence phenotypes and it is associated with susceptibility to various stresses. Already, the treatment with the mentioned 2 molecules showed slight differences in the inhibitory activity of the protein *CnTrr1*. Previous results of *TRR1* evidenced the essentiality of this gene for the *in vitro* growth, and confirm Trr1 as a potential target for research and development of new drugs against the pathogenic fungus *C. neoformans*.

Key words: Thioredoxin reductase 1, Thioredoxin 1, *Cryptococcus neoformans*, Inhibitory molecules, Crystallographic structure.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infecções fúngicas

Indivíduos saudáveis são suscetíveis às infecções superficiais, cutâneas, subcutâneas e, em certos casos, às infecções sistêmicas que causam uma variedade de condições que vão desde pé de atleta e infecções nas unhas até severas doenças disseminadas e com risco de morte (Barrett, 2002). Muitas infecções fúngicas são causadas por patógenos oportunistas, podendo ser endógenas (*Candida*) ou adquiridas a partir do ambiente (*Cryptococcus*, *Aspergillus*) (Garibotto *et al.*, 2010). Infecções por fungos invasivos e dermatomicoses são produzidas por organismos fúngicos em indivíduos com maior vulnerabilidade. Nos últimos anos, a incidência e gravidade das doenças fúngicas tem aumentado, particularmente em pacientes com imunidade comprometida (indivíduos com AIDS, submetidos à quimioterapia e transplantados). O número crescente de casos de fungos envolvidos na sepse é uma tendência que provavelmente continuará em um futuro próximo (Sarmiento *et al.*, 2011).

1.2 Fungos patogênicos

As infecções fúngicas são provocadas por dois tipos de microorganismos: patógenos primários e patógenos oportunistas. Os agentes patogênicos primários são naturalmente capazes de estabelecer uma infecção na população saudável. Em contraste, os agentes oportunistas, são capazes de desenvolver colonização infecciosa do corpo humano quando critérios específicos, como imunossupressão, estão presentes. Os fungos patogênicos podem ser divididos em três grupos principais: os fungos filamentosos, os dimórficos e as leveduras. A maioria dos agentes patogênicos primários são fungos filamentosos, enquanto que a maioria de patógenos oportunistas são leveduras, embora algumas espécies de fungos filamentosos são cada vez mais identificadas como patógenos oportunistas. É importante destacar que as infecções fúngicas podem ser classificadas também em função do tecido infectado (Vandeputte *et al.*, 2012) (Tabela 1).

Tabela 1. Características das principais infecções fúngicas no mundo

Localização no corpo	Tipo de patógeno	Órgão	Gênero mais frequente	Estimativa na incidência da infecção (casos /ano)
Superficial	Primário	Pele e cabelo	<i>Malassezia</i> <i>Trichophyton</i>	~140,000,000
Cutânea	Primário	Pele e unha	<i>Epidermophyton</i> <i>Microsporum</i>	~1,500,000,000

Mucosa	Oportunista	Vagina, trato digestivo, trato urinário e olhos	<i>Candida</i>	~75,000,000
			<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i>	~9,500,000 ~1,000,000
Sistêmica	Oportunista	Qualquer órgão (pulmões, cérebro, sangue etc.)	<i>Candida</i>	~300,000
			<i>Aspergillus</i>	~350,000
			<i>Cryptococcus</i>	~1,000,000
			<i>Histoplasma</i>	~500,000
			<i>Pneumocystis</i>	>200,000
<i>Coccidioidomyces</i>	até 300,000			

Fonte: adaptado de Vandeputte, *et al.*, (2012).

1.3 Doenças humanas causadas por fungos patogênicos

O surto de meningite fúngica causada pelo *Exserohilum rostratum* em pacientes administrados com injeções de esteroides epidurais contaminadas, resultou em 64 mortes nos EUA, recebendo muita atenção já que os casos de meningite atribuídos às variedades de fungos implicados eram tão raros que sua descoberta e tratamento médico trouxeram ao conhecimento público/autoridades de saúde, a dificuldade do tratamento destas infecções fúngicas sistêmicas (Pappas, 2013).

Em geral e com menor avaliação existem vários fungos patogênicos que representam uma ameaça grave para a saúde humana. De fato, atualmente morrem mais pessoas por meningite causadas por *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* em todo o mundo do que pela tuberculose ou a malária (Brown *et al.*, 2012). Os fungos patogênicos mais frequentemente responsáveis por mortalidade humana são: *Aspergillus fumigatus*, *Candida* spp. (predominantemente *C. albicans*), *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis carinii*, e os fungos dimórficos que causam micoses endêmicas (*Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatites* e *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*). Estes fungos representam um risco particularmente elevado para indivíduos com imunidade comprometida, e essa população de hospedeiros suscetíveis está em aumento (Hof, 2010).

Tem havido um aumento na incidência de infecções fúngicas nas últimas décadas, principalmente devido à pandemia de AIDS, aos pacientes que receberam quimioterapia e transplante alogênico de medula óssea, aos pacientes gravemente doentes em unidades de cuidado intensivo, e ao envelhecimento da população humana (Masur *et al.*, 2009). Embora as doenças humanas e animais causadas por micotoxinas (produtos naturais tóxicos produzidos por fungos) tenham efeitos abrangentes sobre a história humana, as infecções fúngicas

humanas geralmente recebem menos atenção do que doenças bacterianas e virais. Apesar da incidência das infecções fúngicas sistêmicas ser consideravelmente inferior do que as infecções superficiais, as taxas de letalidade das infecções fúngicas invasivas são muito elevadas, frequentemente superior a 50%, apesar do uso de drogas antifúngicas (Brown *et al.*, 2012). O diagnóstico precoce da doença e a identificação do agente patogênico fúngico são provavelmente os maiores desafios para o tratamento de infecções fúngicas invasivas. A eficácia das drogas usadas atualmente é limitada por questões como: via de administração, espectro de atividade, biodisponibilidade, toxicidade, resistência aos medicamentos e o alto custo (Calderone *et al.*, 2012). Atualmente, doze drogas antifúngicas estão aprovadas para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas nos EUA e no Brasil. Estes incluem quatro drogas da classe dos azóis: fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol, quatro formulações diferentes de polieno (anfotericina B): anfotericina B deoxicolato, anfotericina B complexo lipídico, anfotericina B dispersão coloidal e anfotericina B liposomal, três drogas da classe das equinocandinas: caspofungina, micafungina e anidulafungina, e uma pirimidina: 5-fluorocitosina. Estes medicamentos antifúngicos são diferentes no espectro de atividade, toxicidade, modos de ação e farmacocinética (Andes 2013).

Atualmente os medicamentos disponíveis não atendem à demanda das infecções por fungos em pacientes com susceptibilidade aumentada, por exemplo, pacientes com câncer, AIDS, HIV, diabetes, transplante de órgãos, ou cirurgia, entre outros (Kathiravan *et al.*, 2012). Novos antifúngicos são urgentemente necessários, porém, encontrar alvos bioquímicos seletivos para mamíferos em patógenos eucarióticos é mais desafiador do que em procariontes ou vírus (Butts e Krysan, 2012). Além disso, devido ao mercado relativamente pequeno, apenas poucas empresas estão trabalhando para desenvolver novos antifúngicos (Brown *et al.*, 2012).

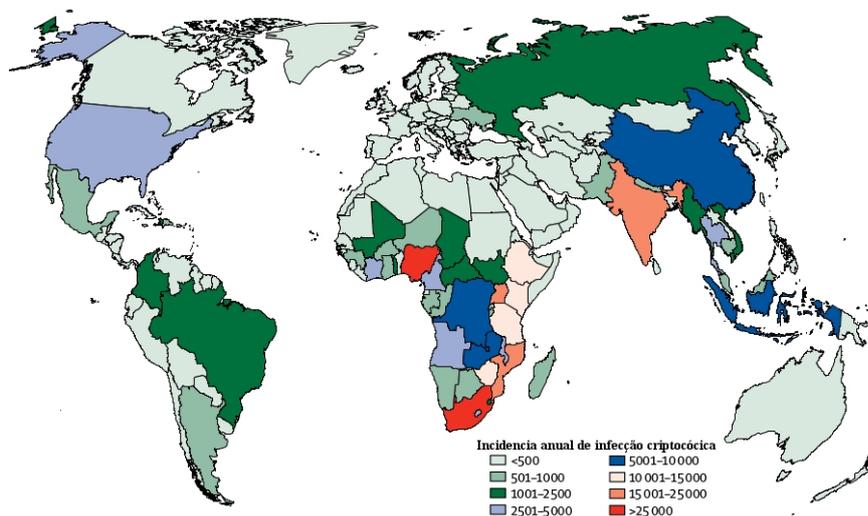
1.4 Criptococose

A criptococose é uma das mais importantes infecções fúngicas sistêmicas nos seres humanos (Chayakulkeeree *et al.*, 2007). Na maioria dos casos a criptococose manifesta-se como meningoencefalite em indivíduos imunocomprometidos e é causada por uma das três espécies principais de *Cryptococcus*: *C. neoformans* var. *grubii*; *C. neoformans* var. *neoformans*; e *C. gattii*. *C. gattii*, apesar de representar apenas 1% desses casos, tem sido alvo de diversas pesquisas devido ao surto da infecção em British Columbia, Canadá, e na região

do Noroeste Pacífico dos EUA, já que tem afetado indivíduos com nenhuma alteração aparente na função imunológica (Rolston, 2013).

Embora a disponibilidade generalizada de terapia anti-retroviral (ART) em países desenvolvidos venha ajudando a melhorar o sistema imunológico de muitos pacientes com HIV de modo que estes não se tornem vulneráveis à infecção por *Cryptococcus*, a meningite criptocócica ainda é um grande problema em países subdesenvolvidos onde a prevalência de HIV é alta e o acesso aos cuidados de saúde são limitados. Os dados mais atuais de 2017, estimam que 220.000 casos de meningite criptocócica ocorrem em pessoas com HIV/AIDS em todo o mundo a cada ano, resultando em quase 181.000 mortes. A maioria dos casos de meningite criptocócica ocorre na África subsaariana (**Figura 1**) (Rajasingham *et al.*, 2017).

A.



B.

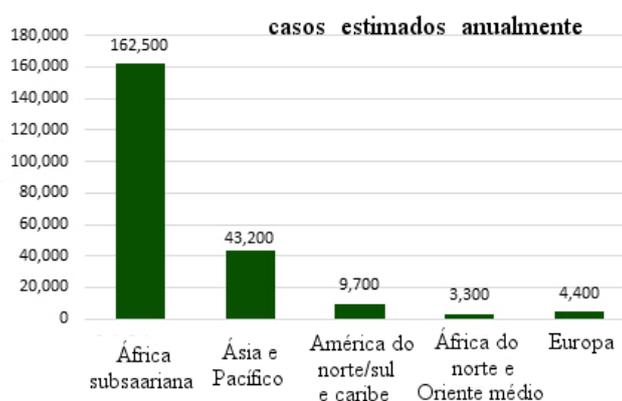


Figura 1. Incidência anual de infecção criptocócica (A) Por país, estimou-se 223.100 casos de incidentes anuais de meningite criptocócica em 2014. **(B)** Carga global de meningite criptocócica relacionada com o HIV. Fonte: adaptado de <http://www.cdc.gov/fungal/diseases/cryptococcosis-neoformans/statistics.html>.

1.4.1 *Cryptococcus neoformans*

C. neoformans é um patógeno oportunista que causa tanto doenças pulmonares quanto meningoencefalite em pacientes imunocomprometidos, embora infecções isoladas tenham sido documentadas em indivíduos sem deficiência aparente do sistema imunológico (D'Souza *et al.*, 2004). Com base nas diferenças antigênicas na cápsula polissacarídica, *C. neoformans* pode ser dividido em quatro sorotipos, A, B, C e D, com um quinto sorotipo AD ocasionalmente observado (Kwon-Chung e Varma, 2006); com base na sua morfologia, bioquímica e genética, foi classificado da seguinte forma: *C. neoformans* variedade *grubii*, o sorotipo A, *C. neoformans* variedade *neoformans*, sorotipo D, e *C. gattii*, os sorotipos B e C, e o sorotipo híbrido AD (Hagen *et al.*, 2010). Várias interespecies híbridas têm sido descritas, como o híbrido entre *C. neoformans* var. *grubii* e *Cryptococcus gattii* (Aminnejad *et al.*, 2012).

O fungo *C. neoformans* é de ampla distribuição mundial, tem sido isolado a partir de diversas fontes como vegetais em decomposição, do solo e particularmente de excretas de aves, como pombos, sendo os últimos uma das maiores fontes ambientais do fungo (Casadevall e Perfect 1998). A criptococose é causada pela inalação de partículas infecciosas (esporos ou células dissecas) que iniciam uma infecção pulmonar (Giles *et al.*, 2009). Uma vez inalado pelo organismo, os propágulos podem crescer nos alvéolos dos pulmões e causar doenças respiratórias. A infecção pode ser assintomática, crônica ou aguda, sendo que infecções pulmonares são a maioria das vezes assintomáticas. Dependendo do estado imunológico do paciente, a criptococose é mais frequentemente reconhecida após a disseminação para o sistema nervoso central onde pode causar meningoencefalite (Voelz e May, 2010). Esta forma clínica é a mais comum na América Latina, com 85% dos casos causado por *C. neoformans*. Segundo Idnurm e cols., nos últimos anos, o uso de terapias antifúngicas e anti-retrovirais provocou uma redução na prevalência de criptococose, porém, a doença não deixou de ser uma preocupação (Idnurm *et al.*, 2005).

1.4.2 Resistência de *Cryptococcus*

Cryptococcus alcançou um importante lugar na micologia clínica como levedura "revestida de açúcar" (cápsula polissacarídica) que pode eficientemente matar o hospedeiro suscetível com e sem tratamento, e representa um importante sistema modelo de fungos para o estudo e desenvolvimento de princípios em patogênese fúngica, diagnóstico e tratamento. Em

primeiro lugar, mostrou-se que diferentes cepas de *Cryptococcus* spp. no local de infecção (por exemplo no espaço subaracnóideo humano) podem funcionalmente reagir de forma diferente no que diz respeito à regulação das respostas ao estresse e genes transportadores (Chen *et al.*, 2014). Em segundo lugar, o mecanismo de heteroresistência ao fluconazol em *Cryptococcus* spp. tem sido descrito por Sionov e cols., e foi demonstrado também *in vivo* (Sionov *et al.*, 2013). Assim, a resistência às drogas pode resultar da plasticidade cromossômica induzida por estresse e a formação de aneuploidia que envolve a duplicação gênica do alvo(s) ou bombas de efluxo aos azóis. Esta observação fenotípica de resistência às drogas ocorre comumente em pacientes com uma alta carga de leveduras no líquido cefalorraquidiano (LCR) durante os efeitos fungistáticos do tratamento com o fluconazol. No entanto, quando a levedura é isolada do hospedeiro e cresce *in vitro* sob condições nutritivas normais, essa aneuploidia é resolvida e a levedura é fenotipicamente susceptível ao azol. Esta desconexão entre os testes *in vitro* e *in vivo* de susceptibilidade antifúngica para *Cryptococcus* pode ser altamente confusa devido à genética e patobiologia da levedura. Em terceiro lugar, o líquido cefalorraquidiano biológico humano, representa um desafio para esta levedura que tem que cumprir com uma série de controles genéticos de adaptação em um ambiente hostil (Lee *et al.*, 2010). Em quarto lugar, é importante ressaltar que, em muitos aspectos, as respostas fenotípicas e genéticas são utilizadas de forma semelhante pelas cepas *C. neoformans* e *C. gattii*. No entanto, existem algumas diferenças entre estas espécies, refletindo nos aproximadamente 40 milhões de anos de separação genética e, portanto a sua fisiopatologia não é exatamente a mesma (Ngamskulrunroj *et al.*, 2012).

1.5 Principais determinantes da virulência

1.5.1 Cápsula

A cápsula polissacarídica rica em resíduos de mananas em torno da parede celular é uma das características marcantes de *C. neoformans* (Doering, 2009). Esta estrutura pode variar em espessura em resposta a várias condições associadas com o hospedeiro, tais como pH neutro/alcalino, níveis elevados de CO₂, baixa glicose, baixos níveis de nitrogênio e soro (Vartivarian *et al.*, 1993). Além disto, sua síntese requer uma complexa ativação das vias metabólicas para fornecer a energia celular e carboidratos, precursores necessários para a modulação desta estrutura complexa (O'Meara e Alspaugh, 2012).

A Capsula de *C. neoformans* é constituída principalmente de glucuronoxilomanano (GXM ~90 a 95%), com uma pequena porção de galactoxilomanano (GalXM ~5%) e manoproteínas (1%), e envolve a parede celular do fungo formando uma barreira física durante a infecção (Zaragoza *et al.*, 2009). Zaragoza e cols., descreveram estudos cinéticos detalhados da formação de cápsula criptocócica. Neste processo de biossíntese, o "custo energético" é altamente dependente da função mitocondrial intacta. O aumento da cápsula também ocorre principalmente durante a fase G1 do ciclo celular, no qual as células estão ativas em processos de crescimento celular (Zaragoza *et al.*, 2010). Estudos demonstraram que a cápsula está relacionada à atividade antifagocítica e imunomodulatória, ela atua na resistência à fagocitose mediada por macrófagos, neutrófilos e monócitos. Resulta na diminuição da fagocitose, havendo considerável diminuição da apresentação de antígenos nas células T, acarretando diminuição da resposta imunológica. Limitações de ferro, íons e aminoácidos, levam à intensa elaboração da estrutura capsular por parte do fungo (Janbon e Doering, 2011).

1.5.2 Melanina

A melanina é um pigmento hidrofóbico, negativamente carregado, formado a partir da polimerização oxidativa de compostos fenólicos. No complexo *Cryptococcus*, a síntese deste composto é catalisada pela enzima lacase a partir de fontes exógenas de 3-4 dihidroxifenil alanina (DOPA), norepinefrina, epinefrina e dopamina (Ngamskulrunroj e Meyer, 2009). Tal atributo confere vantagem ao fungo quando este é exposto a radiação UV, bem como confere proteção às drogas antifúngicas e radicais livres, sendo a lacase codificada pelos genes *LAC1* e *LAC2* (Pukkila-Worley *et al.*, 2005).

1.5.3 Habilidade de crescimento à temperatura fisiológica do hospedeiro mamífero.

Para causar infecção em humanos, *C. neoformans* precisa ser capaz de crescer a 37 °C. Um dos genes envolvidos na tolerância a altas temperaturas é o que codifica a subunidade calcineurina (CNA), uma fosfatase envolvida na resposta ao estresse em leveduras. Os mutantes do gene *CNA1* são incapazes de crescer a 37 °C, bem como apresentam virulência atenuada em modelo de infecção animal, porém crescem normalmente na temperatura ótima para *C. neoformans* (Odom *et al.*, 1997). Análises do perfil transcricional de *C. neoformans* a temperatura fisiológica demonstraram indução da expressão de 49 genes (Kraus *et al.*, 2004).

Rosa e cols., identificaram 29 genes diferencialmente expressos a 37 °C, envolvidos em estresse, sinalização, montagem da parede celular, integridade da membrana e metabolismo (Rosa e Silva *et al.*, 2008). Linhagens mutantes com defeitos de crescimento à 37 °C tendem a serem hipovirulentas, sendo este um dos fenótipos avaliados no estudo de deleção de genes em *Cryptococcus*.

1.6 A evolução de estratégias terapêuticas antifúngicas

Até o século XIX a maioria das doenças infecciosas eram atribuídas a bactérias, parasitas e vírus e talvez casos menos frequentes de doenças por fungos que poderiam ter prevalecido e que antes de 1800 não foram reconhecidas ou documentadas (Knoke e Schwesinger, 1994).

As infecções das mucosas e as sistêmicas são muitas vezes "oportunistas"; tendem a se manifestar quando a imunidade está comprometida, e muitas vezes levam a infecções fatais. Estas infecções são frequentemente associadas a altas taxas de morbidade e letalidade, embora seja pequeno o grupo alvo comparado com contrapartes virais ou bacterianas (Brown *et al.*, 2012). Um estudo realizado pelo Instituto Nacional de Saúde, nos EUA, mostrou que entre 1980 e 1997, a taxa de mortalidade devido às micoses invasivas aumentou em 320% (McNeil *et al.*, 2001). A razão da elevada taxa de morbidade era a falta de diagnóstico, o surgimento de resistência aos medicamentos, e a falta de efetiva terapia antifúngica.

O desenvolvimento de agentes terapêuticos antifúngicos representa um considerável desafio, dado que os fungos são eucariotas como os hospedeiros humanos que eles infectam. Isto deixa poucos alvos distintos que podem ser empregados para o desenvolvimento de antifúngicos. No final dos anos 1950 formulações intravenosas de **polienos** tais como Anfotericina B e Nistatina B foram desenvolvidas como a primeira geração de antifúngicos. Os polienos são drogas anfipáticas que possuem características hidrofóbicas e hidrofílicas sendo capazes de se ligar ao ergosterol da membrana, um componente que é análogo ao colesterol em membranas celulares de mamíferos. No entanto, são problemáticos pela alta toxicidade em seres humanos (Shapiro *et al.*, 2011).

Duas décadas mais tarde, um grande avanço foi feito com o desenvolvimento dos **azóis** com formulações intravenosas e orais. Os azóis tem como alvo a via de biossíntese de ergosterol, inibindo a enzima biossintética 14- α lanosterol demetilase codificada pelo *ERG11* (Odds *et al.*, 2003). Os azóis, incluindo os imidazóis e triazóis, são uma classe de compostos

heterocíclicos de cinco membros contendo nitrogênio, que têm sido o grupo mais amplamente utilizado de antifúngicos por aproximadamente duas décadas. No entanto, este medicamento mostrou desvantagens como a dificuldade de administração e seus efeitos tóxicos. Atualmente, existem cinco drogas triazóis disponíveis para uso clínico, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e cetoconazol. As **equinocandinas**, são uma nova classe de antifúngicos aprovados nas últimas décadas. Atualmente, existem três drogas pertencentes a esta classe que estão disponíveis para uso clínico desde 2001: caspofungina, micafungina e anidulafungina. As equinocandinas são moléculas lipopeptídicas grandes que atuam como inibidores não competitivos da enzima (1,3)- β -D-glucana sintase (codificada pelo *FKS1* em *C. albicans*, *C. neoformans*, e *A. fumigatus* e pelo *FKS1* e *FKS2* em *C. glabrata* e *S. cerevisiae*). A interrupção na síntese deste polissacarídeo resulta na perda da integridade e estresse na parede celular fúngica (Uppuluri *et al.*, 2010).

Como pode ser observado na **Figura 2** a grande maioria dos antifúngicos tem como alvo o ergosterol na membrana da célula fúngica, a biossíntese do ergosterol, ou a biossíntese de (1,3) β -D-glucana, um importante componente da parede celular fúngica (Pierce *et al.*, 2013).

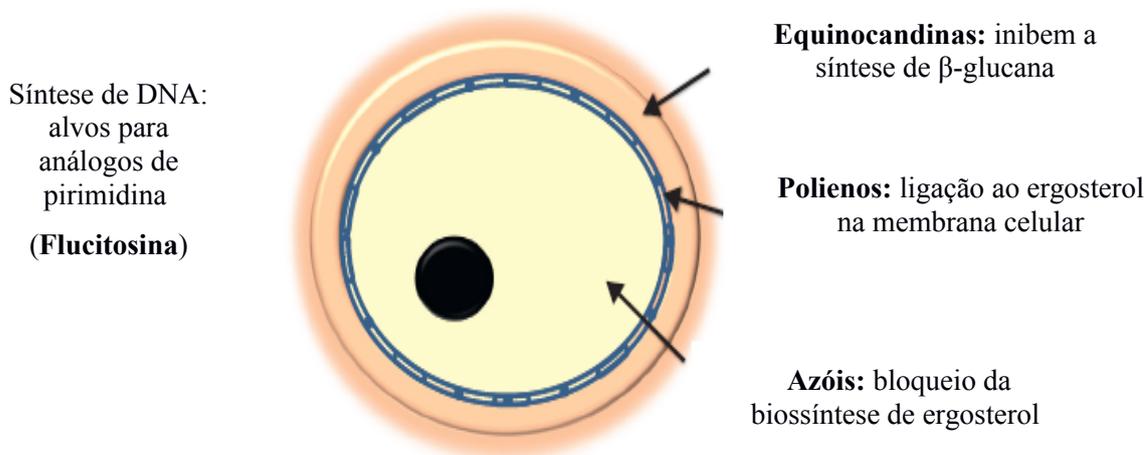


Figura 2. Agentes antifúngicos e seus alvos. Diagrama esquemático que ilustra os mecanismos de ação, em nível celular, das mais importantes classes de agentes antifúngicos utilizados clinicamente. Polienos ligam-se ao ergosterol na membrana da célula fúngica; azóis bloqueiam a biossíntese de ergosterol; equinocandinas inibem a síntese de β -glucana afetando a parede celular do fungo e 5-fluorocitosina inibe a síntese de ácido nucleico. Fonte: adaptado de Pierce *et al.*, (2013) e Brown *et al.*, (2012).

1.7 Mecanismos de resistência a antifúngicos

Apesar da disponibilidade de agentes antifúngicos; a incidência de micoses, a taxa de morte, a complexidade do tratamento e a falta de diagnóstico podem ser atribuídas na maior parte ao surgimento de resistência às terapias antifúngicas. Esta condição é exacerbada, especialmente em pacientes com imunidade comprometida (Pappas *et al.*, 2010).

O fenômeno de resistência ao medicamento pode ser devido a razões multifacetadas tais como, aumento do efluxo da droga, alterações fenotípicas no sítio alvo da droga, recombinações genômicas que minimizam o efeito tóxico do medicamento e formação de biofilmes. Como mostrado na **Tabela 2**, há várias maneiras em que os fungos poderiam desenvolver resistência aos medicamentos (Srinivasan *et al.*, 2014), por exemplo, os azóis são notórios por sua elevada predisposição à resistência através de múltiplos mecanismos, entre eles a expressão de bombas de efluxo e alterações na enzima alvo (Vazquez *et al.*, 2013). Embora a resistência aos polienos seja relativamente rara, vários estudos relataram que as espécies de *Candida* não-*albicans* tais como *glabrata*, *krusei*, e particularmente *lusitaniae* apresentam resistência intrínseca ou têm uma maior propensão para desenvolver resistência aos polienos (Perea *et al.*, 2001). Outros fungos invasivos que exibem resistência intrínseca à anfotericina B são *Aspergillus terreus*, *Trichosporon beigelii*, *Fusarium* sp., *Scopulariopsis* sp. e fungos dematiáceos, com taxas de mortalidade maiores de 70% (Collin *et al.*, 1999). Entretanto, *C. neoformans* exibe resistência intrínseca às equinocandinas (Shapiro *et al.*, 2011). Mesmo assim, o crescente surgimento de cepas resistentes às equinocandinas pode ser considerado um sinal de urgência para a busca da próxima geração de antifúngicos (Berenguer *et al.*, 1997).

Além destes medicamentos, alilaminas, antimetabólitos e análogos de pirimidina, também têm sido usados desde 1970. Mesmo assim, as cepas fúngicas rapidamente desenvolveram resistência pela mutação e interferência dos transportadores celulares desses compostos (Perlin, 2011). Por esta razão, se recorre à terapia de combinação com azóis ou anfotericina B. A administração de combinações antifúngicas é muito rara por causa de fatores de alto risco, tais como interações multidrogas, toxicidade e algumas preocupações sobre potenciais efeitos antagônicos.

Tabela 2. Antifúngicos e mecanismos mais frequentes de resistência aos medicamentos

Antifúngicos	Modo de ação	Mecanismo de ação	Mecanismo de resistência
Polienos Anfotericina B Nistatina	Fungicida	Ligação ao ergosterol e ligação aos esteróis na membrana celular. Permeabilização da membrana através da formação de canais	-Redução da concentração de ergosterol e ablação da ligação da droga alvo. -Alteração na família do gene <i>POL</i> .
Azóis Fluconazol Itraconazol Cetoconazol Posaconazol Voriconazol Miconazol	Fungistático	Afeta a biossíntese do ergosterol bloqueando a enzima chave, 14 α -lanosterol demetilase (Erg11p).	-Efluxo da droga pelos transportadores de múltidrogas; nos genes da família ABC. -Substituição de aminoácidos de Erg11p afetando a ligação da droga alvo. -Superexpressão de Erg11p minimizando o efeito da droga. -Alteração na concentração de esterol tóxico, devido a mutação no alelo Erg3.
Equinocandinas Caspofungina Micafungina Anidulafungina	Fungistático ou fungicida	Ligação à β -(1,3)-D-glucana sintase e inibição da β -(1,3)-D-glucana, um componente da parede celular.	-Mutação nas unidades de ligação Fks1 e Fks2.
Alilaminas Terbinafina Naftifina	Fungistático	Interfere com a biossíntese de ergosterol pela inibição da esqualeno epoxidase (Erg11p).	-Interferência de transportadores múltidrogas.
Análogos de pirimidina 5-flucitosina	Fungicida	Inibe a síntese celular do DNA e RNA afetando a maquinaria molecular.	-Mutação em citosina permease e deaminase.

Fonte: adaptado de Srinivasan *et al.*, (2014).

1.8 Busca de potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas

Moléculas antifúngicas potentes foram descobertas em décadas anteriores, mas apenas algumas delas avançaram nos estudos clínicos necessários para comprovação de sua eficácia e segurança (Lewis, 2011). Alguns dos principais problemas de saúde, tais como vários tipos de câncer, doenças infecciosas, diabetes e doenças neurodegenerativas necessitam de medicamentos inovadores, entretanto, o desenvolvimento de novas drogas ocorre lentamente

e envolve um alto custo. De acordo com phRMA (*Pharmaceutical Research and Manufacturers of America*), dentre 5.000 a 10.000 moléculas testadas, normalmente apenas uma chega ao mercado, sendo um processo que leva em média de 10 anos para ser finalizado dependendo da área terapêutica (dados atuais <http://www.phrma.org/innovation/clinical-trials>), e pode custar até 2,6 bilhões de dólares para se colocar uma única droga disponível. Além disso, a resistência aos fármacos ameaça a utilidade do limitado arsenal de agentes antifúngicos.

O acesso às sequências genômicas completas de patógenos e do genoma humano trouxe a possibilidade de que genes-alvo possam ser racionalmente identificados (Saïdani *et al.*, 2009). Segundo Felipe e cols., a análise global do transcriptoma de *P. brasiliensis* forneceu informações sobre as sequências relacionadas ao ciclo celular, resposta ao estresse, resistência à droga, e as vias de transdução de sinais do patógeno (Felipe *et al.*, 2005). Assim, a crescente disponibilidade de genomas completos permite abordar a estratégia de busca e desenvolvimento de novas drogas antifúngicas usando uma abordagem comparativa de diferentes genomas, visando identificar genes de relevância para a sobrevivência do patógeno (Rispaill *et al.*, 2009).

A identificação de genes conservados essenciais necessários para o crescimento de fungos patogênicos oferece uma estratégia ideal para a busca de novos alvos de drogas antifúngicas. Hu e cols., demonstraram por meio da estratégia de substituição de um promotor condicional a essencialidade de genes presentes no fungo patogênico *A. fumigatus*. Esta estratégia utilizou o promotor regulável de nitrogênio *NiiA* (*PNiiA*) para excluir e substituir o promotor endógeno de genes selecionados. Ao aplicar esta estratégia para 54 genes de diversas ações biológicas, cujas funções ortólogas são conhecidas por serem essenciais para o crescimento em *S. cerevisiae* e *C. albicans*, estes autores identificaram 35 genes essenciais para o crescimento micelial em *A. fumigatus* (Hu *et al.*, 2007).

Através de genômica comparativa, realizada pelo nosso grupo, que foi empregada com o objetivo de identificar e selecionar possíveis genes alvo presentes no transcriptoma/genoma de *P. lutzii* (Pb01) e em genomas de outros fungos patogênicos humanos de relevância mundial (*A. fumigatus*, *B. Dermatidis*, *C. albicans*, *C. immitis*, *C. neoformans*, *H. capsulatum* e o gênero *Paracoccidioides* spp.) foram encontrados 57 genes, contendo 55 essenciais e 2 genes não essenciais (*kre2* e *erg6*) considerados importantes para a viabilidade e para a

interação patógeno-hospedeiro de várias espécies de fungos patogênicos humanos. Como resultado, foram identificados 10 genes ortólogos ausentes no genoma humano e presentes em fungos patogênicos humanos (**Tabela 3**), entre estes, quatro genes (*trr1*, *rim8*, *kre2* e *erg6*) foram selecionados como possíveis candidatos para a busca de novas drogas antifúngicas. Dois desses genes codificam para proteínas (Trr1 e Kre2) que mostraram identidade significativa quando comparados com modelos já depositados no banco de dados de estruturas PDB, os quais foram usados para realizar modelagem por homologia para ambas enzimas (Abadio *et al.*, 2011). Os quatro alvos escolhidos além de serem essenciais para a viabilidade da célula fúngica, deveriam cumprir com outros 6 critérios de seleção: estar presente em todos os patógenos analisados, estar ausente no genoma humano, ser preferivelmente uma enzima para facilitar os ensaios de atividade biológica, não ser auxotrófico, possuir uma localização celular acessível a drogas, e ter preferencialmente uma estrutura tridimensional homóloga no PDB.

Tabela 3. Potenciais genes alvo selecionados para desenvolvimento de novas drogas antifúngicas.

Gene	Processo Biológico	Citlocalização	Molde no PDB	Organismo	Identidade de seqüência (%)
<i>Trr1</i>	Homeostases redox celular	Citoplasma	1ITJ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
			1VDC	<i>Arabidopsis thaliana</i>	57
<i>aur1</i>	Metabolismo celular	Golgi e membrana plasmática	*	*	*
<i>mak5</i>	Biogênese do ribossomo	Nucléolo	1HV8	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	30
<i>chs1</i>	Biogênese/degradação da parede celular	Membrana plasmática	*	*	*
<i>tom40</i>	Transporte de proteína	Membrana da mitocôndria	2QK9	<i>Homo sapiens</i>	34
<i>kre6</i>	Biogênese/degradação da parede celular	Membrana do Golgi	2VY0	<i>Pyrococcus furiosus</i>	32
<i>fks1</i>	Organização da parede celular/biogênese	Membrana plasmática	1R1M	<i>Neisseria meningitidis</i>	32
<i>kre2</i>	Manosilação de proteínas	Membrana do Golgi	1S4N	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
<i>erg6</i>	Biossíntese de ergosterol	Membrana do Retículo endoplasmático	3BUS	<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>	32
<i>rim8</i>	Regulador de resposta ao pH	Citoplasma	3G3L	<i>Bacteroides fragilis</i>	38

* Estrutura ausente no PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Fonte: adaptado de Abadio *et al.*, (2011).

A determinação da localização intracelular de proteínas é importante para entender melhor a função proteica. Além de ser importante para a avaliação e identificação de possíveis alvos de drogas e sua acessibilidade (Cseke *et al.*, 2011). Segundo Vandeputte e cols., várias abordagens nos últimos anos têm sido desenvolvidas, os pesquisadores pretendem descobrir novas drogas antifúngicas testando compostos médicos já existentes, compostos naturais a partir de fontes como plantas e microorganismos, ou por meio do *screening* de compostos químicos (Vandeputte *et al.*, 2012).

1.9 CnTrr1 como alvo molecular para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas

No citoplasma da maioria das células as proteínas encontram-se no estado reduzido, em contraste com as proteínas extracelulares onde ligações dissulfeto são comumente encontradas e ajudam a manter a sua estrutura em um ambiente muito hostil. Tioredoxinas e glutaredoxinas são proteínas termoestáveis capazes de reduzir pontes dissulfeto nas proteínas-alvo. Estas oxidoreduções contêm duas cisteínas vizinhas em seu sítio ativo que após redução do dissulfeto alvo tornam-se oxidadas. O dissulfeto da tioredoxina é reduzido numa reação catalisada pela tioredoxina redutase a partir do NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) como doador de elétrons. (Ritz e Beckwith, 2001).

As tioredoxinas redutases (Trr) são oxidoreduções necessárias para a redução do sítio ativo dissulfeto da tioredoxina (Trx), portanto, responsáveis pela manutenção do conjunto de Trxs reduzidas e ativas. A tioredoxina redutase é uma flavoenzima que se liga a um dinucleotídeo de flavina-adenina e ao NADPH. Está localizada no citoplasma das células fúngicas e desempenha um papel crítico na manutenção do estado redox de células. As flavoenzimas contêm dois centros redox: um FAD e um grupo dissulfeto/ditiol em cada subunidade. Assim, a tioredoxina redutase faz parte de um complexo conhecido como sistema tioredoxina, que contêm a tioredoxina, tioredoxina redutase e NADPH, atuando como um sistema de dissulfeto redutase. Portanto, a função desse sistema é reduzir pontes dissulfeto em proteínas-alvo (**Figura 3**).

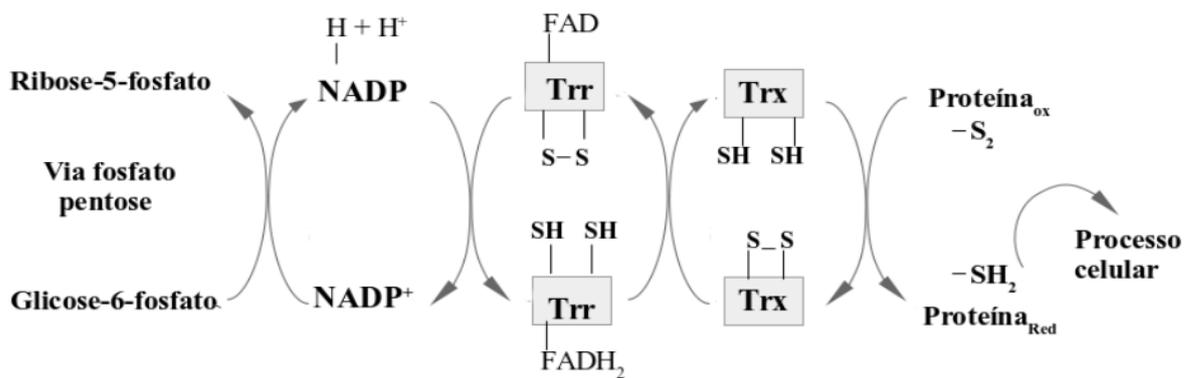


Figura 3. Cascata do sistema redox da tioredoxina redutase. A nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) + H⁺ é gerada pela via fosfato pentose. NADPH + H⁺ reduz a tioredoxina redutase oxidada (Trr_{ox}), que regenera o conjunto de Trx reduzida (Trx_{red}). Trx reduzida contribui para manter um ambiente redutor para diferentes proteínas. A Trr, possui dois centros redox, um grupo dissulfeto- ditiol, que reduz a tioredoxina, e um cofator (FAD), que recebe elétrons provenientes do NADPH. Fonte: adaptado de Lee *et al.*, (2013), com modificações.

Trr/Trx constituem um sistema fundamental para defesa contra estresse oxidativo, além disso, o sistema Trx em bactérias, leveduras e mamíferos está envolvido na regulação da síntese de DNA, na modulação das vias de sinalização intracelular e extracelular, na regulação de fatores de transcrição, na modulação da resposta imunitária e no crescimento celular e apoptose (Arnér e Holmgren, 2000).

Dois tipos de Trr foram caracterizadas, a isoforma de alta massa molecular (H-Trr) (~55 kDa), presente em mamíferos e alguns parasitas e a isoforma de baixa massa molecular (L-Trr) (~35 kDa) encontrada na maioria das bactérias, plantas e fungos. Entretanto, a identidade de sequência entre L- e H-Trr é de apenas ~20%. Além disso, H-Trr tem um centro redox-ativo (com um padrão CXXXXC) no domínio de ligação ao FAD, que não tem equivalente no domínio de ligação ao FAD das L-Trr. Na L-Trr, o dissulfeto redox ativo (motivo CXXC) está localizado no domínio de NADPH. Outra diferença das H-Trr é um domínio C-terminal (o domínio de interface), ausente em L-Trr, que é responsável pela dimerização e está envolvido na catálise (Hirt *et al.*, 2002). Embora estas isoformas apresentem funções semelhantes, as estruturas das proteínas são muito diferentes, e conseqüentemente a tioredoxina redutase pode ser um alvo terapêutico seletivo contra fungos patogênicos. Em eucariotos superiores, a distância entre esses domínios e sua orientação permite a transferência de elétrons a partir de NADPH para o dissulfeto da Trx sem a necessidade de uma grande alteração na conformação da Trr. Em procariotos e fungos, os

domínios de ligação ao NADPH e ao FAD estão localizados em lados opostos da molécula, necessitando de uma alteração conformacional significativa para que ocorra o transporte de elétrons. Além disso, os centros redoxi dissulfeto-ditiol estão enterrados dentro da cadeia polipeptídica, criando uma barreira estérica para redução da tioredoxina. Os estados finais decorrente deste movimento dos domínios foi observado na tioredoxina redutase de *E. coli*, que pode adotar uma conformação alternativa, denominada FR (forma reduzida), em que os domínios de ligação ao NADPH e ao FAD sofrem uma rotação de 67°, permitindo assim a transferência de elétrons (Lennon *et al.*, 2000). Esta rotação faz a transição entre as conformações FO e FR, colocando o NADPH e o centro dissulfeto próximos ao anel da flavina e expõe, assim, os resíduos de cisteína para interagirem com a tioredoxina (Oliveira *et al.*, 2010). Em mamíferos existem duas tioredoxinas redutases, a citosólica e a mitocondrial, que são codificadas por genes diferentes. Estas isomorfias são selenoproteínas e contêm um resíduo de selenocisteína próximo ao carbono terminal, que é essencial para a sua atividade (Nordberg e Arnér, 2001).

Embora, as Trr isoladas de eubactérias e eucariotas inferiores têm sido extensivamente caracterizadas, não existe informação disponível sobre a estrutura tridimensional de Trr em fungos patogênicos humanos. Em *S. cerevisiae*, há duas enzimas tioredoxina redutase localizadas em diferentes compartimentos, ScTrr1 no citoplasma e ScTrr2 na mitocôndria. A deleção do gene *Trr1* de *S. cerevisiae* mostra defeitos extremos de crescimento e sensibilidade ao H₂O₂. Em relação à tioredoxina de *S. cerevisiae*, há duas citosólicas (ScTrx1 e ScTrx2) e uma mitocondrial (ScTrx3) (Zhang *et al.*, 2009). ScTrx1 e ScTrx2 apresentam 78% de identidade de sequência de aminoácidos e demonstram 46% (ScTrx1) e 43% (ScTrx2) de identidade de sequência de aminoácidos com ScTrx3 (Oliveira *et al.*, 2010). Em decorrência dessa homologia, esses autores mostraram que ScTrr1 citosólica é capaz de reduzir as três tioredoxinas, Trx1, Trx2 e Trx3 de *S. cerevisiae*, com eficiência. Entretanto, ScTrr1, não é capaz de reduzir tioredoxinas de *E. coli* e *Homo sapiens*. Dessa forma, ScTrr apresenta uma atividade espécie específica com a tioredoxina de levedura.

A análise da estrutura de Trr1, em *S. cerevisiae*, mostrou que o monômero (**Figura 4**) é composto por dois domínios β - α - β - α - β que formam os sítios de ligação ao NADPH e ao FAD. Os resíduos de cisteína (Cys¹⁴²-Ala-Val-Cys¹⁴⁵) são encontrados em um *loop* que contém o sítio de ligação ao NADPH e formam uma ligação dissulfeto, que está próxima ao FAD (Oliveira *et al.*, 2010).

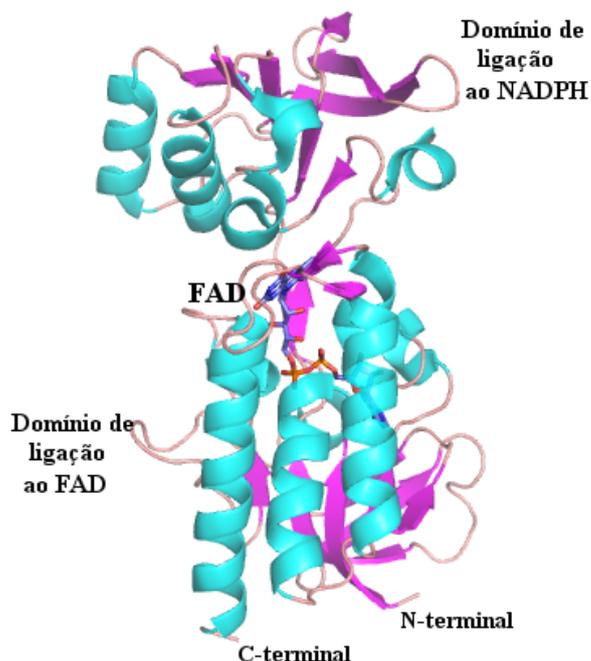


Figura 4. Estrutura global do monômero Trr1 de *S. cerevisiae*. Fonte: adaptado de Oliveira *et al.*, (2010).

As tioredoxinas (Trx) são pequenas proteínas redox encontradas em todas as células vivas. Elas sofrem uma redução dependente de NADPH pelas Trxs redutases e em seguida reduzem grupos de cisteínas oxidadas em proteínas alvo. A atividade catalítica da Trx baseia-se nas duas cisteínas redox ativas na sequência altamente conservada WCGPC. O mecanismo proposto para a ação redutora da tioredoxina envolve a ligação de um substrato oxidado X-S₂ à uma superfície hidrofóbica da proteína. Neste ambiente hidrofóbico do complexo, o tiolato do resíduo de cisteína amino-terminal (Cys³² na tioredoxina de *E. coli*) age como um nucleófilo, se ligando covalentemente ao substrato através de um dissulfeto misto intermediário –Cys³²-S-S-X-. A forma desprotonada da cisteína carboxi-terminal (Cys³⁵ na tioredoxina de *E. coli*) então ataca este dissulfeto, liberando o substrato reduzido X-SH e a tioredoxina oxidada –C32-C35-, que pode ser novamente reduzida pela tioredoxina redutase (Holmgren, 1985). A atividade tem sido encontrada fora da célula (estimulação do crescimento celular e quimiotaxia), no citoplasma (regulação da atividade de um fator de transcrição) e na mitocôndria (Powis e Montfort, 2001).

Trx é uma molécula altamente estruturada com 90% de seus resíduos envolvidos em elementos estruturais secundários regulares ou voltas envolvendo ligações hidrogênio. Para outras proteínas, esse número é usualmente menor que 70%. A primeira estrutura tridimensional de Trx de um organismo fotossintético resolvida, foi a Trx2 de *Anabaena* sp.

(Dai *et al.*, 1996). Estudos estruturais de dois tioredoxinas, Trx *m* e Trx *f*, de cloroplastos foram determinados poucos anos depois (Capitani *et al.*, 2000). As estruturas foram determinadas na forma oxidada, para Trx *f* recombinante (Trx *f-L*) (**Figura 5**) e também na forma oxidada e reduzida para Trx *m* (a uma resolução de 2.1Å e 2.3Å, respectivamente). As estruturas de Trx *f* e Trx *m* exibem uma típica *Trx-fold* consistindo de folhas- β centrais flanqueadas por 4 α -hélices. Estas hélices são anfipáticas e interagem com a folha- β central. Trx *f* contém uma α -hélice adicional no N-terminal e uma terceira cisteína exposta perto do sítio-ativo. As estruturas tridimensionais das Trxs do cloroplasto são bastantes semelhantes, no entanto, as duas proteínas têm uma topologia de superfície e distribuição de carga diferente ao redor do sítio-ativo (Capitani *et al.*, 2000).

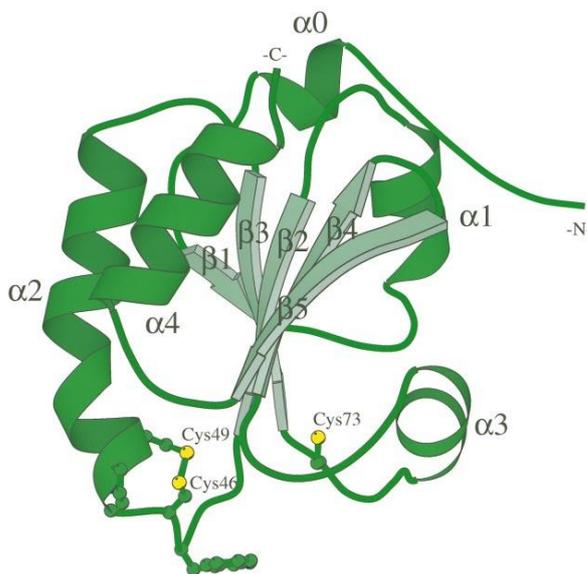


Figura 5. Estrutura global do monômero Trx *f* de cloroplastos de espinafre. As cadeias laterais dos resíduos do motivo do sítio ativo WGGPC aparecem no modo *balls and sticks*, bem como a cadeia lateral de Cys⁷³. Fonte: adaptado de Capitani *et al.*, (2000).

1.10 Viabilidade celular do alvo Trr1 e o seu substrato

A tioredoxina redutase é uma enzima antioxidante, que está localizada no citoplasma das células fúngicas e desempenha um papel crítico na manutenção do estado redox de células (Kontou *et al.*, 2004). Para se entender o mecanismo de ação dos antifúngicos específicos para Trr1 é necessário que se compreenda qual o papel deste na biologia do fungo em questão. Trr mantém as proteínas tioredoxina em seu estado reduzido e conseqüentemente ativo. Já Trx, quando em seu estado reduzido, regula o estado de oxidação e a função de diversas proteínas (Williams *et al.*, 2000). Em *C. neoformans* a deleção de *TRR1* resulta na perda de viabilidade celular enquanto que mutantes *trx1Δ* apresentam um defeito grave de crescimento e são sensíveis ao estresse oxidativo (Missall e Lodge, 2005; Upadhyya *et al.*, 2013). Os

componentes do sistema da tioredoxina, representado pela tioredoxina Trx1 e Trx2 e tioredoxina redutase, estão envolvidos na redução e reciclagem da forma oxidada, inativa da peroxidoredoxina (Wood e Hollomon, 2003). Em *C. neoformans*, a deleção destes genes tornam o fungo sensível ao estresse oxidativo, embora com um fenótipo menos severo do que a cepa *ts1A* (peroxidoredoxinas 2-Cys), e diminui a sobrevivência em condições de cultura com macrófagos (Missall e Lodge, 2005). Em outros fungos patogênicos como *C. albicans*, Trx1 é necessária para a ativação da proteína cinase Hog1 e para modulação da atividade do fator de transcrição Ap-1 em resposta ao estresse oxidativo (da Silva Dantas *et al.*, 2010). Na levedura *S. cerevisiae*, mutações de levedura que não possuem ambas as Trxs citosólicas são viáveis, mas têm uma fase mais longa na fase S do ciclo celular (Muller, 1991). Mutantes que não possuem a *ScTrx3* são hipersensíveis ao hidroperóxido. Portanto, *ScTrx3* parece ter funções como agente antioxidante contra ROS geradas na mitocôndria (Pedrajas *et al.*, 1999).

Missall e Lodge demonstraram que o gene *TRRI* é essencial para o crescimento em *C. neoformans*. Portanto, para reduzir a expressão de *TRRI*, estes autores escolheram substituir o promotor endógeno deste gene por um promotor induzível de um transportador de cobre. O promotor utilizado foi uma versão melhorada do promotor *CTR4* descrito previamente como *pCTR4-2* (Ory *et al.*, 2004). A cepa resultante, *P_{TRRI}::P_{CTR4-2}*, foi crescida na presença de cobre para reduzir a expressão do gene *TRRI*. Com o uso de PCR em tempo real, detectou-se uma redução maior que 23 vezes na expressão de *TRRI* depois de 2 h de tratamento com 25 μ M de CuSO_4 . *P_{TRRI}::P_{CTR4-2}* cresceu em extrato de levedura-peptona-dextrose (YPD) com 200 μ M BCS (*Bathocuproinedisulfonic acid*) apenas um pouco mais lento do que o tipo selvagem H99 considerando que é incapaz de sobreviver em YPD com 25 μ M CuSO_4 (Missall e Lodge, 2005).

Atualmente, uma das estratégias usadas para a o desenvolvimento de novos fármacos, é a seleção de genes essenciais ou importantes para a viabilidade dos fungos patogênicos humanos (Ianiri e Idnurm, 2015). Seguindo essa estratégia, o estudo funcional do gene essencial *TRRI* em paralelo com a caracterização estrutural e o uso de compostos capazes de bloquear a atividade catalítica do gene alvo, são temas abordados nos próximos três capítulos desta tese de doutorado, com o intuito de compreender o papel do sistema tioredoxina redutase em *C. neoformans* como um promissor alvo para o desenvolvimento de antifúngicos.

2. JUSTIFICATIVA

As infecções fúngicas constituem um problema de saúde crescente, e seu impacto é cada vez maior devido ao aumento do número de pacientes criticamente enfermos, oncológicos e imunocomprometidos, que impacta fortemente o sistema de saúde pública. As altas taxas de letalidade associadas a essas infecções claramente indicam as falhas existentes nas atuais terapias como o arsenal limitado de drogas antifúngicas, a alta toxicidade dos antifúngicos administrados e o surgimento de resistência nestes fungos que representam uma limitação e um desafio para a comunidade científica e médica. Além disso, o desenvolvimento de drogas antifúngicas estagnou na última década, já que as grandes empresas farmacêuticas têm focado seus esforços na geração de drogas mais rentáveis para tratar as condições crônicas, demonstrando uma necessidade urgente de uma nova geração de agentes antifúngicos mais específicos, que ofereçam um tratamento seguro contra as micoses sistêmicas.

Tendo em vista a necessidade do desenvolvimento de novos antifúngicos, o nosso grupo propôs identificar novas moléculas capazes de inibir a função de proteínas essenciais para a viabilidade desses agentes causadores de infecções fúngicas. A tioredoxina redutase é um dos potenciais alvos antifúngicos, o gene é essencial em vários patógenos humanos (*C. neoformans*, *C. albicans*, *P. falciparum*, *A. fumigatus* e *S. aureus*) e representa um alvo ideal para o desenvolvimento de medicamentos antifúngicos com amplo espectro de atividade (Ianiri e Idnurm, 2015). Recentemente, mostrou-se a eficácia *in vitro* de pequenas moléculas inibidoras, utilizando a sequência do gene *TRR1* de *Paracoccidioides lutzii*, entretanto tais moléculas não foram capazes de bloquear o crescimento do patógeno *C. neoformans*. Provavelmente as diferenças sutis na sequência proteicas podem gerar estruturalmente diferenças próximas ao sítio catalítico que afetam a ligação com os compostos (Abadio *et al.*, 2015).

No presente, este trabalho de doutorado dá continuidade ao projeto de pesquisa maior: “Pós-genoma de fungos patogênicos humanos visando o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas”, que tem como objetivo o estudo funcional e estrutural de genes conservados em fungos patogênicos humanos. Primeiro, a necessidade de conhecer a estrutura tridimensional de Trr1 e o seu substrato Trx1 por cristalografia vem da informação que o arranjo tridimensional dos átomos na molécula pode ser um fator determinante na descoberta de potenciais antifúngicos mais específicos que atuem de forma mais segura. Para a proteína

CnTrr1 e seu substrato *CnTrx1*, não existiam evidências experimentais prévias, já que esta é a primeira vez que essas proteínas são purificadas e cristalizadas para o fungo patogênico humano *C. neoformans*. Segundo, devido à variação nos fenótipos de mutantes *trrΔ*, é importante desvendar os fenótipos que levam a perda da viabilidade celular em *C. neoformans* e que ainda não foram caracterizados. Estudos em outros organismos mostram que essas proteínas estão envolvidas na regulação da sinalização em resposta ao estresse oxidativo, entretanto não há nenhum estudo que aborde o papel sinalizador de *TRR1* em *C. neoformans*. Terceiro, a comparação e análise estrutural de *Trr1* e *Trx1* em *C. neoformans* com outras estruturas homólogas, fornece informações valiosas sobre os seus mecanismos enzimáticos, estabilidade termodinâmica, e propriedades redox. E por último, estudos estruturais com potenciais moléculas inibidoras identificadas *in silico* sugerem estratégias para o desenvolvimento de inibidores fungo-específicos, que podem elucidar funções ainda desconhecidas.



CAPÍTULO I

**Caracterização estrutural das proteínas
recombinantes Trx1 e Trr1 de *C. neoformans***

1. OBJETIVO GERAL

Determinar a estrutura cristalina da proteína alvo Trr1 e o seu substrato Trx1 do fungo patogênico humano *C. neoformans* por difração de raios X.

1.1 Objetivo específicos

- a) Caracterizar as propriedades físico-químicas da proteína recombinante Trr1, sendo analisada por fluorimetria e dicroísmo circular (CD).
- b) Estabelecer as condições de cristalização das proteínas Trr1 e Trx1 recombinantes.
- c) Determinar a estrutura 3D das proteínas Trr1 e Trx1 por difração de raios X.
- d) Avaliar o modelo de *Cn*Trr1 na conformação reduzida (FR), e o complexo simulado Trr1-Trx1 de *C. neoformans*.
- e) Utilizar a estrutura 3D da Trr1_{ox} e o modelo na conformação reduzida Trr1_{red} (FR) para análise *in silico* de possíveis ligantes (*docking*).

2. TIOREDOXINA (Trx)

A primeira parte do **capítulo I**, escrito em forma de artigo científico (artigo a ser submetido à Revista *Biochemical and Biophysical Research Communications*) inicia com os estudos estruturais de Trx1. Nesse capítulo nós relatamos a expressão, purificação e a resolução da estrutura cristalográfica da proteína recombinante tioredoxina 1 de *C. neoformans*, que encontra-se depositada no PDB sob o código 5JY5.

Os resíduos de cisteína em proteínas citosólicas são mantidos em seu estado reduzido, mas podem sofrer oxidação devido a modificações pós-traducionais durante a sinalização redox ou sob condições de estresse oxidativo. Em grande parte, a redução das cisteínas de proteínas oxidadas é mediada por uma pequena oxi-redutase de 12 kDa, tioredoxina (Trx), que fornece equivalentes redutores para enzimas metabólicas centrais. Trx foi identificada pela primeira vez, em virtude da sua capacidade para reduzir a ribonucleotídeo redutase (RNR), uma enzima envolvida na síntese e reparo do DNA (Laurent *et al.*, 1964). Desde essa descoberta, Trx tem sido reconhecida por regular a atividade de uma miríade de proteínas em organismos procarióticos e eucarióticos. O NADPH e a tioredoxina redutase (Trr), constituem um dos sistemas antioxidantes centrais na célula (Holmgren, 1985). Coletivamente, esse complexo redox funciona ao retransmitir os equivalentes de redução de NADPH para o ditiol do sítio ativo da Trx, que posteriormente os usa para reduzir ligações dissulfeto em proteínas alvo (Palde e Carroll, 2015).

Apesar da existência de diversas investigações científicas que abordam aspectos funcionais desta proteína, dados estruturais em fungos patogênicos humanos oportunistas, ainda são escassos. O sequenciamento da proteína *CnTrx1* revelou o sítio ativo altamente conservado formado pelos resíduos Cys-Gly-Pro-Cys. Estruturalmente, as duas cisteínas presentes no sítio ativo (Cys³⁰ e Cys³³) foram encontradas em sua forma oxidada na qual as sulfidrilas (-SH) estão unidas formando uma ponte dissulfeto. Embora a sequência de *CnTrx1* e a estrutura terciária sejam muito similares às outras Trx oxidadas e reduzidas de várias espécies, este estudo forneceu o análise estrutural da tioredoxina que revela sutis diferenças relacionadas ao seu estado oxidado e com regiões conservadas conhecidas por participar da reação catalítica com outras proteínas alvo.

Title: Crystal structure of Thioredoxin 1 enzyme from *Cryptococcus neoformans* at 1.80 Å resolution

Authors: Claudia Patrícia Bravo-Chaucanes¹, Ana Karina Abadio², Erika Seki Kioshima³, Maria Sueli Soares Felipe^{1,4}, João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa^{1*}

Affiliations: ¹Laboratory of Molecular Biophysics, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil, ²Department of Biology, University of Mato Grosso State -Nova Xavantina, Mato Grosso, Brazil, ³Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Paraná, Brazil. ⁴Genomic Sciences and Biotechnology, Catholic University of Brasilia, Brasília, Brazil.

*Corresponding author e-mail address joaobarbosa@unb.br

Keywords: Thioredoxin, Heterologous expression, X-ray structure, *Cryptococcus neoformans*.

The abbreviations used are: AIDS. Acquired immune deficiency syndrome. CSS. Complex formation significance score.

ABSTRACT

The prevalence of cryptococcal infection caused by the *Cryptococcus* fungus is high, mainly in low-income countries. It constitutes a global public health problem due to the number of people at risk, the limited utility of antifungal therapy, and the AIDS-related increased mortality. The thioredoxin-thioredoxin reductase system is one of the major regulators of redox homeostasis and antioxidant defense, forming and reducing protein disulfide bonds in all three domains of life. This activity plays a crucial role since the thioredoxin reductase is essential for *Cryptococcus neoformans*. Thioredoxin 1 from *C. neoformans* (*CnTrx1*) was cloned and expressed in *E. coli* and the recombinant protein was purified and crystallized. Functional assay shows that *CnTrx1* catalyses the reduction of insulin disulfide bonds using dithiothreitol (DTT). Moreover, we solved the crystal structure of oxidized *CnTrx1* at 1.80 Å resolution, the second Trx structure from a human pathogenic fungus. Our data show that *CnTrx1* is a monomer in solution, with a typical Trx-fold containing the conserved Cys-Gly-Pro-Cys active-site motif. Subtle differences, particularly within and around the catalytic site, could be detected when we compared to other thioredoxin protein structures. Although the thioredoxins have been isolated and characterized from many organisms, this new structural report provides important insights for understanding the binding and specificity to Trx-targets and the development of novel antifungal agents.

1. Introduction

Thioredoxins (Trxs) are the major ubiquitous heat-stable disulfide reductases (12 kDa average) responsible for maintaining proteins in their reduced state inside cells. They are reduced by electrons from NADPH via the flavin enzyme Trx reductase (TrxR) [1]. Trxs are involved in a wide variety of fundamental biological functions such as, protection against

oxidative stress [2], acts as a hydrogen donor for reductive enzymes such as ribonucleotide reductase, thioredoxin peroxidases [3,4] and methionine sulfoxide reduction [5]. They also modulate transcription factors involved in increased DNA binding [6,7] apoptosis [8] and important roles in the life cycles of viruses and phages [9], among other processes. The wide variety of reactions of Trx is based on its broad substrate specificity and potent capacity to reduce multiple cellular targets [1].

Thioredoxins are found in all living cells from archaeobacteria to mammals. All Trx proteins possess an active site made up of two cysteine residues embedded in a conserved motif, Cys-Gly-Pro-Cys [10]. Trxs use these cysteine residues to break disulfide bonds in oxidized substrate proteins. These two cysteines are oxidized and form a disulfide bridge. Their catalytic cycles are completed through disulfide reduction by electron donors of the thioredoxin and glutaredoxin families [11]. Trxs are found in several cellular locations such as the cytosol [6], the nucleus [12] and the mitochondria [13] or are secreted to the extracellular environment [14]. In plants, thioredoxins regulate enzymatic activities in the chloroplasts [15]. Immunocompromised patients, cancer and transplant patients show increased susceptibility to fungal pathogens [16–18], of particular concern is the high rate of mortality associated with invasive fungal infections, which often exceeds 50% despite the availability of several antifungal drugs [19]. In resource-limited regions, Cryptococcosis is an important opportunistic fungal infection that represents more deaths than those caused by tuberculosis or malaria as a result of global HIV/AIDS pandemic [18]. In *Cryptococcus neoformans*, the Trx function *in vivo* as part of a disulfide reducing system (thioredoxin system) that is composed of two small Trx proteins and one flavoprotein, Trx reductase, the latter being essential for this pathogen [58]. The redox control of the thioredoxin system is thought to regulate the expression of many stress defense enzymes and protect cells against oxidative stress. The Trx1 and Trx2 from *C. neoformans* are cytoplasmic isoforms that are important not only to stress resistance, but also to virulence. It was demonstrated that the *trx1Δ* mutant has a severe growth defect and is sensitive to multiple stresses, while the *trx2Δ* mutant is only sensitive to nitric oxide stress. It appears that Trx1 is more important than Trx2 for the normal functioning of *C. neoformans* [20].

The primary structure of several Trxs are known. The full-length vary from 105 to 110 amino acids and share between 27 and 69% sequence identity [21]. In addition, since the first Trx three-dimensional structure was achieved in 1975, namely, the *E. coli* protein with a maximum resolution of 2.8 Å [22], the structures of several Trxs have been solved such as *M. sympodialis* [23], *S. cerevisiae* [24], *P. falciparum* [25], spinach chloroplasts [26], *L. vannarrei* [27] and humans [28]. Trx1 protein sequence of *C. neoformans* exhibits 52% identity with Trx from the skin-colonizing yeast *M. sympodialis*, and 43% with *H. sapiens* Trx. Despite the extensive literature regarding Trxs, new structures are attractive for further investigation as they contribute to understand the structural properties, the molecular mechanisms and the catalytic activity of the thioredoxins that dictate species and isoforms specificities. Hence, in this paper, we report the expression, purification and the X-ray crystal structure of recombinant thioredoxin 1 protein from *C. neoformans* (*CnTrx1*) solved at 1.80 Å resolution (PDB ID: 5JY5). This is the second thioredoxin structure of a human fungal pathogen, which reveals subtle variations in its oxidized state.

2. Material and Methods

2.1 Cloning and expression

A synthetic codon-optimized gene of Trx1 from *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* H99 (GeneBank CNAG_02801) was designed for its expression in *E. coli* as a C-terminal six-histidine fusion protein for affinity purification. The PCR product was cloned into *NdeI* and *XhoI* restriction sites of the pET21a expression vector (Epoch Life Science, Inc.). The recombinant protein with 6×His-tag was expressed in *E. coli* strain BL21 (λ DE3) pLysE (Novagen, San Diego, CA, USA). *E. coli* cells were grown in 1 L of Luria Bertani (LB) medium which was supplemented with ampicillin (100 μ g/mL) and chloramphenicol (20 μ g/mL) at 37 °C until reaching an $OD_{600nm} = 0.6$ at which point protein expression was induced with 1.0 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) with a shake rate of 220 rpm for 6 h.

2.2 Extraction and purification

Cells were harvested by centrifugation, suspended in 30 mM Tris-HCl, pH 8.5, 300 mM NaCl and 10 mM imidazole. The cells were lysed by 10 cycles of 50 seconds sonication in an ice bath with a 50% amplitude and 50 seconds rest. After lyses, the sample was centrifuged at 9000 g for 40 min at 4 °C. The recombinant protein obtained from the cytoplasmic fraction was filtered through a 0.45 μ m disposable filter and applied to a nickel affinity column of 1 mL (Hi-Trap, GE Healthcare) according to the standard protocols, increasing the imidazole concentration from 10 to 500 mM in a stepwise manner eluted the recombinant protein. Eluted *Cn*Trx1 protein was further purified by gel filtration using a Superdex 75TM 10/300 GL column on an ÄKTA-FPLC (GE Healthcare Biosciences, USA) pre-equilibrated against the buffer containing 30 mM Tris-HCl, pH 8.5 and 300 mM NaCl. The proteins used as standards in the calibration curve were: 1. aprotinin 6.5 kDa, 2. ribonuclease A 13.7 kDa, 3. carbonic anhydrase 29.0 kDa, 4. ovalbumin 43.0 kDa and 5. conalbumin 75.0 kDa. Blue dextran 2000 was employed to determine the column void volume. All the fractions were analysed by 15% SDS-PAGE, Coomassie blue staining [29] and Western blot. Fractions containing pure thioredoxin were pooled and dialyzed against 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 and 300 mM NaCl, using an Amicon ultracentrifuge 2 kDa cut off concentrator (Millipore) and concentrated and frozen at -20 °C.

2.3 Protein crystallization

Prior to crystallization, the protein was submitted to dynamic light scattering (DLS) to assess its polydispersity in a Malvern Zetasizer Nano ZS90 equipped with a 633-nm He-Ne laser and operating at an angle of 173°. 500 μ L of each sample (0.3 mg/mL concentration) was measured in quartz cuvette at 18 °C. Samples were diluted in 10 mM tris buffer (pH 8.0-8.5). A minimum of three measurements was performed for each sample. The crystallization was performed using solutions from the commercial screening kits 1 and 2 of Hampton research. Crystallization was carried out in 24-well plates using the vapor diffusion technique in sitting or hanging drop mode. The *Cn*Trx1 crystals were obtained in drops containing 2 μ L of protein sample (9 mg/mL) and 2 μ L of reservoir solution. The drops were equilibrated against 500 μ L reservoir solution. After optimization, crystals with hexagonal morphology grew to a maximal size of $\sim 380 \times 330 \times 210 \mu\text{m}^3$ within two weeks by hanging drop vapor-diffusion method at 294 K using 1.7 M ammonium sulfate and 0.02 M tris hydrochloride pH 8.5* (Anexo A).

2.4 Data collection, structure determination and refinement

The X-ray diffraction data were collected using synchrotron radiation at the protein crystallography MX2 beamline by the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) in Campinas-Brazil, using a PILATUS2M detector from Dectris to record the oscillation data with $\Delta\phi = 0.5^\circ$, covering a total oscillation range of 360° . Data were collected at 100 K in a nitrogen gas stream. *CnTrx1* were soaked in cryoprotectant solution (reservoir solution supplemented with 25% glycerol for 15 min). The data processing for the determination of the unit-cell parameters, integration, merging and scaling of reflections was performed using the programs *DENZO/SCALEPACK* of the HKL2000 program Package [30]. The *CnTrx1* crystals diffracted to 1.8 Å (wavelength = 1,2398 Å). The crystal structure was determined using the molecular replacement method as implemented in the program MOLREP of CCP4i [31]. The thioredoxin model available at the PDB with code 2J23 [23] served as search template. Two Trx molecules were found in the asymmetric unit in agreement with Matthews coefficient prediction [32]. The structures were revised and modeled using COOT [33] and refined with REFMAC5 [34]. MolProbity was used to assess the quality of the final model [35]. Coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank (www.rcsb.org) under the accession code 5JY5. The data collection/processing and refinement statistics are summarized in **Table 1**.

2.5 Enzymatic activity assay for *CnTrx1*

Enzymatic activity of the recombinant *CnTrx1* was assessed using insulin (Sigma-Aldrich) as described previously by Holmgren [36], with modifications. The assay is based on the dithiol-disulfide oxidoreductase activity that catalyzes the reduction of insulin and is restored by dithiothreitol (DTT). Three fractions of *CnTrx1* containing 22.9 (2.0), 45.8 (4.1) and 93.9 µg (8.2 µM) were prepared by dilution in deionized water. The final reaction mixture contains: 0.1% w/v bovine insulin in 50 mM Tris HCl pH 7.5, 63 mM sodium phosphate pH 7.0, 2.0 mM EDTA, zero (control) or 80 µL of the *CnTrx1* fractions and 1.0 mM DTT. The final volume was adjusted to 1 mL by addition of deionized water. The precipitation of insulin was monitored as an increase in absorbance at 650 nm (ΔAbs_{650}) using a UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu) in the absence (control) or presence of different amounts of *CnTrx1*. The activity ($\Delta\text{Abs}_{650}/\text{min}$) was considered as the ΔAbs_{650} during 15 minutes taken in a graph region of linear increase. Thioredoxin concentrations were determined from their absorption at 280 nm applying molar extinction coefficients.

3. Results and Discussion

3.1 Expression, purification and characterization of *CnTrx1* recombinant protein

CnTrx1 was expressed successfully in *E. coli* cells, tagged at its C-terminal with a six-histidine sequence. An anti-poly-His monoclonal antibody (Sigma-Aldrich) was used in a Western-blot of an SDS-PAGE of the expression soluble fraction to show a band of about 12 kDa (Supplementary Fig. 1). Purification followed via metal affinity chromatography and subsequently size exclusion chromatography (Supplementary Fig. 2). His-*CnTrx1* was eluted from the nickel-affinity column in standard buffer containing 300 mM imidazole and a flow rate of 1 mL/min. The results indicated by size exclusion chromatography (void volume of 13.16 mL) and dynamic light scattering experiments (DLS) indicate that *CnTrx1* behaves as a monomer in solution. DLS mass estimation was 13.5 kDa with a polydispersity index of

14.7%, compatible with monomers as reported for thioredoxins from other species. The yield of *CnTrx1* was approximately 9 mg/L of bacteria culture.

The enzymatic activity of *CnTrx1* was assayed by its capacity to reduce the disulfide bonds of insulin (Supplementary Fig. 3), while the nonphysiological reductant dithiothreitol (DTT) is used to restore the enzyme. In the control cuvette, without *CnTrx1*, no precipitation was observed. The addition of 2.0, 4.1 and 8.2 μM *CnTrx1* resulted in a precipitation appearing after 23, 17 and 12 minutes, respectively. The activity of *CnTrx1* ($\Delta\text{Abs}_{650}/\text{min}$) was 0.007, 0.011 and 0.016. Previous work shows that using slight different conditions, Trxs from other organisms showed a higher relative specific activity (data not shown) [36]. This difference might be due to the experiments being conducted at different pHs and Trx concentrations.

3.2 Overall crystallographic structure

Crystals were obtained using *CnTrx1* at 9 mg/mL in 1.7 M ammonium sulfate and 0.02 M tris hydrochloride pH 8.5. The crystals belonged to the primitive hexagonal space group $P6_422$, with unit-cell parameters a and $b = 110.706 \text{ \AA}$, $c = 91.761 \text{ \AA}$, α and $\beta = 90.00^\circ$, and $\gamma = 120.00^\circ$. A Matthews coefficient of $2.36 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ for two molecules in the asymmetric unit and a solvent fraction of 47.97% represented the highest probable asymmetric unit content. The crystal structure of the recombinant *CnTrx1* has been determined at 1.80 \AA resolution by molecular replacement. The refined model presented a final $R_{\text{factor/free}}$ of 0.155/0.198 with good stereochemistry. The data processing and refinement statistics are shown in Table 1. There are no Ramachandran plot outliers, with 98.4% of the residues in the most favored regions and the rest in allowed regions [37]. All residues, except for Met¹, could be located in the electron density and the side chains of residues Ile⁵, Ser¹⁶, Thr²⁸ and Ser³⁷ in monomer A, Lys⁴² and Ile⁹⁵ in monomer B and Met³⁵ and Met⁷² in both monomers were found to occupy two different conformations. In molecule A, which was used for the calculation of the solvent-accessible surface, all the side chains of the amino acids on the surface are well defined, except of Lys³⁴, Lys⁹⁴ and Lys¹⁰¹ residues. These side chains are solvent exposed and, thus, freely movable. A total of 347 water molecules were modelled.

The final model of *CnTrx1* contains two molecules in the asymmetric unit, each comprised of residues 2-106. The last two residues correspond to part of the His-tags (His¹⁰⁵ and His¹⁰⁶) added to the original *CnTrx1* sequence; with the following four C-terminal histidines undefined, probably due to flexibility. Met⁷² and Pro⁷³ peptides were found to form a *cis* conformation. The general fold of *CnTrx1* consist of a five-stranded β -sheet surrounded by two α -helices on each side (Fig. 1a), in agreement with the typical fold to the other Trx structures reported: Trx_{1ox} and Trx_{1red} from *S. cerevisiae* [24,38], Trx_{ox} from *M. sympodialis* [23], Trx_{ox} from spinach chloroplasts [26], Trx_{ox} from *S. mansoni* [39], Trx_{ox} from *D. melanogaster* [40], Trx_{ox} from *C. reinhardtii* [41], Trx_{ox} from *E. coli* [42] and Trx_{ox} and Trx_{red} from human [43]. The order of the structural secondary elements can be followed in the topology (Fig. 1b). Sequence alignment (Fig. 1d) shows that *CnTrx1* shares a sequence identity of 52%, 46%, 43% and 35% with Trxs of *M. sympodialis* (2J23), *S. cerevisiae* (2OE0), *H. Sapiens* (5DQY) and *E. coli* (1XOA), respectively. The molecular architecture of *CnTrx1* is very similar to Trx1 of *M. sympodialis*, which was determined at 1.4 \AA maximum resolution, and the superposition of these two structures reveals great similarity with a root mean square deviation of 0.65 \AA for all C $_{\alpha}$ atoms (Supplementary Tab. 1). The superposition revealed one conformational difference, the deletion of two residues (Gly⁴⁹ and Asp⁵⁰) in *C. neoformans* leads to the loss of small helix after the second helix. In the case of the superposition of *CnTrx1* to the human thioredoxin (*HsTrx*) (PDB 5DQY), the RMSD is

higher, 1.22 Å for all Ca atoms, although the three dimensional structure is still very similar. The differences are at the end of helix $\alpha 1$ where Gly¹⁹-Asp²⁰ of the *HsTrx* is deleted in fungi and the presence of three cysteine residues, at positions 62, 69 and 73, in addition to the active cysteines (positions 32 and 35 in humans). Among these, the Cys⁷³ is involved in disulfide-linked dimerization [44].

It is currently known that the crystallographic and solution structures of the Trxs can form monomers [23,45] and dimers [28,40,44]. *ScTrx2* at ~40 μ M behaves almost exclusively like a monomer with only 2% existing as dimers as observed in a gel filtration experiment [46]. The results of size exclusion chromatography and DLS show that *CnTrx1* behaves as a monomer in solution at micromolar concentration. Thus, the two independent molecules of *CnTrx1* found in the asymmetric unit can be described as a crystallographic dimer with a NCS 2-fold rotation axis. This is also in agreement with the PISA server that implicates the dimer interface in an auxiliary role in complex formation, not able to maintain complex by itself (calculated CSS of 0.152) [47]. The interface area between subunit A and B is about 601 Å² corresponding to just 10.5% of the total surface of both monomers. This interface is stabilized by seven hydrogen bonds involving 8 residues: Thr²⁸, Trp²⁹, Gly³¹, Glu⁵⁸, Glu⁶¹, Gln⁶⁸, Lys⁷⁰ and Met⁷². Lys⁷⁰ and Met⁷² main chain hydrogen bonding forms a small interchain antiparallel β -sheet that includes Ala⁷¹ (Fig. 2). This β -sheet also appear in the natural covalent dimer observed in *HsTrx* and *LvTrx* in which Ala⁷¹ is substituted by Cys that form a disulphide bridge responsible for dimer maintenance. This probably indicates that dimeric thioredoxin involved in response to the specific needs of higher animals may pass through an oxidizing environment during export, and, under sufficiently higher thioredoxin concentrations, could protect the active site from oxidizing conditions [44]. Crystallographic data from shrimp thioredoxin (*LvTrx*) obtained under different redox conditions reveal a dimeric arrangement mediated by Cys⁷³ residues of each monomer [27] (Fig. 2a). It seems that this feature is present in some Trxs of vertebrates and crustaceans, as opposed to yeast that does not present this characteristic structural feature in the quaternary structure.

3.3 The active site

In both chains the conserved active site amino acids WCGPC (Trp²⁹-Cys³³) were clearly defined in the electron density. These amino acids are located after strand $\beta 2$ with Pro-Cys forming the first turn of the helix $\alpha 2$. The cysteines were found in the oxidized form in both monomers, with a disulfide bond length of 2.10 and 2.36 Å in chain A and B (Fig. 1c), respectively. There are no other cysteine residues in the sequence, similar to the *Malassezia* yeast. Although there is no study addressing the *CnTrx1*_{red}, several studies in other organisms confirm that there are only very small differences observed in the active-site loop, residues 28 to 35, and dimer interface of Trx_{ox} with respect to Trx_{red} [44, 45]. Since the active site changes seem insufficient to explain the differences in activity shown by different thioredoxins, the reason may be related to their interaction with target proteins [43].

The surface of *CnTrx1* shows the side chain of Cys³⁰ is oriented towards the solution while only the sulfur of Cys³³ is exposed to the solvent. The catalytic motif located on the exposed surface of the molecule demonstrates its importance to participate in the interaction with cellular targets. Surrounding residues to the active site of *CnTrx1* such as, Asp²⁴, Ala²⁷, Thr²⁸, Trp²⁹, Gly³¹, Pro³², Pro⁷³ and Thr⁷⁴ are highly conserved in *M. sympodialis*, *S. cerevisiae*, *E. coli* and *H. sapiens*. Asp²⁴ has low solvent accessibility in *CnTrx1*, since it is located in the inner part of the hydrophobic cavity; with an internal bound water molecule at the cavity that is bridging Asp²⁴ and Cys³³ (hydrogen bonded to the sulfur) (Fig. 2c). This water molecule,

which is associated with catalytic activity of the protein, is a conserved feature among Trx of several species such as the oxidized forms of the yeasts *M. sympodialis* and Trx1 of *S. cerevisiae* [23,24] and the insect Trx of *D. melanogaster* [40]. Compared to other Trxs, a Phe is replaced by Tyr²⁵ in *CnTrx1*. The hydroxyl group of Tyr²⁵ makes H-bonds to the side chains of Trp¹¹ and Tyr⁷⁸. The Trp²⁶, also conserved in yeast, makes a hydrogen bond to a water molecule and is stacked by a glycerol molecule. These interactions help position the aromatic rings in a way as to protect the side chain of Cys³³ from the solvent.

3.4 Comparison of conserved residues with other Trx structures

The conserved Asp⁵⁸ (Fig. 1d) has been implicated in the active site stabilization by forming a hydrogen bond to Trp²⁹ [25]. In *CnTrx1* the Asp is substituted by Glu⁵⁸. Superposition of Trx_{ox} and Trx_{red} molecules against *CnTrx1*_{ox}, revealed that the conserved Trp of the WCGPC motif can present in different positions near the active site. We observed Trp²⁹ rings are positioned facing close to the site, at a distance of about 7.0 Å and stabilized by its hydrogen bond with Glu⁵⁸. This Trp in *C. neoformans* has a similar position that Trx_{ox} of *M. sympodialis* (2J23) and *S. cerevisiae* (2FA4) and Trx_{red} of *H. sapiens* (3TRX). In contrast, in *T. brucei* Trx_{red} (1R26) the Trp is flipped out and interacts with a neighboring protein molecule (Fig. 2d), demonstrating its suppleness to adopt different positions and support interaction with different redox partners of thioredoxin [48]. Trp²⁹ of *CnTrx1* compared to Trp³¹ of a *HsTrx*_{ox} (5DQY) showed a displacement of the indole ring of approximately 2.8 Å and induces a conformational change to Met⁷². Both amino acids are part of the interface forming hydrogen bonds to the other molecule (Trp^{29A}-Glu^{58B} and Met^{72A}-Lys^{70B}). Glu⁵⁸ replaces Asp seen in *M. sympodialis*, *S. cerevisiae*, *D. Melanogaster*, *C. reinhardtii*, *E. coli* and human proteins, but apparently without any alteration of the main chain confirmation. The *cis*-Pro⁷³ in loop α3-β4 is another conserved residue close to the active site of *CnTrx1*. This *cis*-Pro is a key functional group in the active sites of these thiol-disulfide oxidoreductases and precludes metal binding in human thioredoxin [49]. Recently Iqbal and colleagues (2015) showed the 3 conserved prolines surrounding the water cavity of an ancestral yeast thioredoxin 1 (yTrx1): Pro³², *cis*-Pro⁷³ and Pro³⁸, provide rigidity and a relative hydrophilicity important for the formation of the water cavity [50]. The conserved Gly⁸⁹ was also identified and appears to facilitate the interaction with other proteins such as thioredoxin reductase to engage properly with the active site [21]. In general, the conformation of the active site of *CnTrx1*_{ox} is very similar to the *S. cerevisiae* Trx1_{red} (2I9H) [38] and human Trx_{red} (3TRX) [51] solved by nuclear magnetic resonance (NMR). In the three structures the side chain of Cys³⁰ is exposed at the surface and the side chain of Cys³³ is directed towards the interior of the protein. Compared with reduced Trx2 of *S. cerevisiae* [52] some structural differences were observed. In *ScTrx2* the Cys³¹ is exposed to the surface and the Trp³⁰ is more buried than Trp²⁹, in *CnTrx1*. The other residues conserved and close to the active site as, Asp²⁴, Ala²⁷, Pro⁷² and Gly⁸⁹ retain the same orientation. Similar to Trp²⁶ of *CnTrx1*, a phenylalanine residue replace this position in *ScTrx2*, and it is at a shorter distance from Cys³³ to prevent the side chain from contacting the solvent.

Fig. 3 displays the surfaces of *CnTrx1*_{ox} colored according to electrostatic potential. It was observed strongly negative charged patch near the catalytic site Cys³⁰ and Trp²⁶, specifically involving Glu⁶, Asp⁵⁶, Glu⁵⁸, Glu⁵⁹ and Glu⁶¹ residues, and a distribution of hydrophobic residues Ile⁵, Trp²⁹ and Val⁵⁷. Similarity, the distribution of the electrostatic potential in thioredoxin *m* of chloroplasts showed a negative charge distribution near the active site Trp³⁶ [26]. Also it was observed, the side chain of Trp²⁹ of one monomer is located in a hydrophobic cavity formed by the residues Val⁵⁷, Ala⁶⁴, Ile⁶⁹ and Met⁷¹ of the other subunit, consistent with

D. melanogaster thioredoxin, that exhibit a negative charged surface patch around helix $\alpha 3$ [40], which is necessary to making contact with thioredoxin reductase a potential molecular target [26,53]. *CnTrx1* also exhibited a positively charged patch near the catalytic site Pro³² and Cys³³ involving Lys³⁴ and His³⁹. Additional superficial residues bearing a positive charge, Lys², Lys⁴², Lys⁵¹ and Lys⁵⁴, also contribute to the positive electrostatic potential around this area.

In conclusion, although *CnTrx1* sequence and tertiary structure is very similar to other thioredoxins, this study has provided structural analysis of the first structure of an opportunistic human pathogenic fungus *C. neoformans* which has revealed subtle structural differences related with its oxidized state and with conserved regions known to participate in the catalytic reaction with other target proteins. This manuscript shows a comparison of the Trx1 protein from *C. neoformans* with Trxs from one yeast-like basidiomycete fungus and other safe non-pathogenic fungus, in addition to human Trx. The study has shown only minor changes between *C. neoformans* Trx1 and *M. sympodialis* Trx. However, the x-ray diffraction analysis, suggests that the Trp residue has a structural function into the active site, and the hydrophobic pocket around this region is important to mediate the protein-protein recognition. Finally, in *CnTrx1*, the two molecules of the asymmetric unit are arranged as a monomer and it does not have additional three cysteine residues present in *HsTrx*, supporting the conclusion that dimerization is more favored in higher eukaryotes protein.

Conflict of interest: The authors have declared that no competing interests exist.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) (<http://www.cnpq.br/>) and FAP-DF (Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal) (<http://www.fap.df.gov.br/>). We thank the Brazilian Synchrotron Light Source (LNLS) for the beam time and assistance in data collection.

References

- [1] A. Holmgren, Thioredoxin, *Annu. Rev. Biochem.* 54 (1985) 237–271.
- [2] F. Monje-Casas, C. MICHÁN, C. Pueyo, Absolute transcript levels of thioredoxin-and glutathione-dependent redox systems in *Saccharomyces cerevisiae*: response to stress and modulation with growth, *Biochem. J.* 383 (2004) 139–147.
- [3] C.T. Laurent, M.E. Colleen, R. Peter, Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 3436–3444.
- [4] S.W. Kang, H.Z. Chae, M.S. Seo, K. Kim, I.C. Baines, S.G. Rhee, Mammalian Peroxiredoxin Isoforms Can Reduce Hydrogen Peroxide Generated in Response to Growth Factors and Tumor Necrosis Factor- α , *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 6297–6302. doi:10.1074/jbc.273.11.6297.
- [5] P.G. Porqué, A. Baldesten, P. Reichard, The involvement of the thioredoxin system in the reduction of methionine sulfoxide and sulfate, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 2371–2374.

- [6] E.S.J. Arnér, A. Holmgren, Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 6102–6109. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x.
- [7] H. Schenk, M. Klein, W. Erdbrügger, W. Dröge, K. Schulze-Osthoff, Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 (1994) 1672–1676.
- [8] D. Ravi, H. Muniyappa, K.C. Das, Endogenous thioredoxin is required for redox cycling of anthracyclines and p53-dependent apoptosis in cancer cells, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 40084–40096. doi:10.1074/jbc.M507192200.
- [9] A. Holmgren, Thioredoxin and glutaredoxin systems, *J Biol Chem.* 264 (1989) 13963–13966.
- [10] A. Holmgren, Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action., *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 9113–9119.
- [11] J.-F. Collet, J. Messens, Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins, *Antioxid. Redox Signal.* 13 (2010) 1205–1216.
- [12] K. Hirota, M. Murata, Y. Sachi, H. Nakamura, J. Takeuchi, K. Mori, J. Yodoi, Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus a two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-κB, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 27891–27897.
- [13] G. Powis, W.R. Montfort, Properties and biological activities of thioredoxins., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41 (2001) 261–95. doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.261.
- [14] S.-Z. Xu, P. Sukumar, F. Zeng, J. Li, A. Jairaman, A. English, J. Naylor, C. Ciurtin, Y. Majeed, C.J. Milligan, TRPC channel activation by extracellular thioredoxin, *Nature.* 451 (2008) 69–72.
- [15] S. Dai, C. Schwendtmayer, K. Johansson, S. Ramaswamy, P. Schürmann, H. Eklund, How does light regulate chloroplast enzymes? Structure–function studies of the ferredoxin/thioredoxin system, *Q. Rev. Biophys.* 33 (2000) 67–108.
- [16] S.A. Schmalzle, U.K. Buchwald, B.L. Gilliam, D.J. Riedel, *Cryptococcus neoformans* infection in malignancy, *Mycoses.* (2016).
- [17] P.G. Pappas, B.D. Alexander, D.R. Andes, S. Hadley, C. a Kauffman, A. Freifeld, E.J. Anaissie, L.M. Brumble, L. Herwaldt, J. Ito, D.P. Kontoyiannis, G.M. Lyon, K. a Marr, V. a Morrison, B.J. Park, T.F. Patterson, T.M. Perl, R. a Oster, M.G. Schuster, R. Walker, T.J. Walsh, K. a Wannemuehler, T.M. Chiller, Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET)., *Clin. Infect. Dis.* 50 (2010) 1101–1111. doi:10.1086/651262.
- [18] B.J. Park, K.A. Wannemuehler, B.J. Marston, N. Govender, P.G. Pappas, T.M. Chiller, Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS, *AIDS.* 23 (2009) 525–530. doi:10.1097/QAD.0b013e328322ffac.
- [19] G.D. Brown, D.W. Denning, N.A. Gow, S.M. Levitz, M.G. Netea, T.C. White, Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 4: 165rv13, (2012).

- [20] T.A. Missall, J.K. Lodge, Function of the thioredoxin proteins in *Cryptococcus neoformans* during stress or virulence and regulation by putative transcriptional modulators, *Mol. Microbiol.* 57 (2005) 847–858. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04735.x.
- [21] H. Eklund, F.K. Gleason, a Holmgren, Structural and functional relations among thioredoxins of different species., *Proteins.* 11 (1991) 13–28. doi:10.1002/prot.340110103.
- [22] A. Holmgren, B.O. Söderberg, H. Eklund, C.I. Brändén, Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72 (1975) 2305–2309.
- [23] A. Limacher, A.G. Glaser, C. Meier, P. Schmid-Grendelmeier, S. Zeller, L. Scapozza, R. Cramer, Cross-reactivity and 1.4-Å crystal structure of *Malassezia sympodialis* thioredoxin (Mala s 13), a member of a new pan-allergen family., *J. Immunol.* 178 (2007) 389–96. doi:178/1/389 [pii].
- [24] R. Bao, Y. Zhang, X. Lou, C.-Z. Zhou, Y. Chen, Structural and kinetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* thioredoxin Trx1: implications for the catalytic mechanism of GSSG reduced by the thioredoxin system, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Proteins Proteomics.* 1794 (2009) 1218–1223.
- [25] M. Peng, D. Cascio, P.F. Egea, Crystal structure and solution characterization of the thioredoxin-2 from *Plasmodium falciparum*, a constituent of an essential parasitic protein export complex, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456 (2015) 403–409.
- [26] G. Capitani, Z. Marković-Housley, G. DelVal, M. Morris, J.N. Jansonius, P. Schürmann, Crystal structures of two functionally different thioredoxins in spinach chloroplasts., *J. Mol. Biol.* 302 (2000) 135–154. doi:10.1006/jmbi.2000.4006.
- [27] A.A. Campos-Acevedo, R.R. Sotelo-Mundo, J. Pérez, E. Rudino-Pinera, Is dimerization a common feature in thioredoxins? The case of thioredoxin from *Litopenaeus vannamei*, *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* 73 (2017) 326–339.
- [28] J. Hwang, L.T. Nguyen, Y.H. Jeon, C.Y. Lee, M.H. Kim, Crystal structure of fully oxidized human thioredoxin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467 (2015) 218–222.
- [29] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* 227 (1970) 680–685.
- [30] Z. Otwinowski, W. Minor, [20] Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.* 276 (1997) 307–326.
- [31] A. Vagin, A. Teplyakov, Molecular replacement with MOLREP, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 22–25.
- [32] B.W. Matthews, Solvent content of protein crystals, *J. Mol. Biol.* 33 (1968) 491–497.
- [33] P. Emsley, K. Cowtan, Coot: Model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 60 (2004) 2126–2132. doi:10.1107/S0907444904019158.

- [34] G.N. Murshudov, P. Skubák, A.A. Lebedev, N.S. Pannu, R.A. Steiner, R.A. Nicholls, M.D. Winn, F. Long, A.A. Vagin, REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 67 (2011) 355–367.
- [35] I.W. Davis, A. Leaver-Fay, V.B. Chen, J.N. Block, G.J. Kapral, X. Wang, L.W. Murray, W.B. Arendall III, J. Snoeyink, J.S. Richardson, MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) W375–W383.
- [36] A. Holmgren, Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide., *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 9627–9632.
- [37] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–291.
- [38] A.S. Pinheiro, G.C. Amorim, L.E.S. Netto, F.C.L. Almeida, A.P. Valente, NMR solution structure of the reduced form of thioredoxin 1 from *Sacharomyces cerevisiae*, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 70 (2008) 584–587.
- [39] Y. Li, P. Li, Y. Peng, Q. Wu, F. Huang, X. Liu, X. Li, H. Zhou, D. Guo, D. Shi, Expression, characterization and crystal structure of thioredoxin from *Schistosoma japonicum*, *Parasitology.* 142 (2015) 1044.
- [40] M.C. Wahl, A. Irmeler, B. Hecker, R.H. Schirmer, K. Becker, Comparative structural analysis of oxidized and reduced thioredoxin from *Drosophila melanogaster*, *J. Mol. Biol.* 345 (2005) 1119–1130.
- [41] V. MENCHISE, C. CORBIER, C. DIDIERJEAN, M. SAVIANO, E. BENEDETTI, J.-P. JACQUOT, A. AUBRY, Crystal structure of the wild-type and D30A mutant thioredoxin h of *Chlamydomonas reinhardtii* and implications for the catalytic mechanism, *Biochem. J.* 359 (2001) 65–75.
- [42] L.W. Schultz, P.T. Chivers, R.T. Raines, The CXXC motif: crystal structure of an active-site variant of *Escherichia coli* thioredoxin, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 55 (1999) 1533–1538.
- [43] J. Qin, G.M. Clore, A.M. Gronenborn, The high-resolution three-dimensional solution structures of the oxidized and reduced states of human thioredoxin, *Structure.* 2 (1994) 503–522.
- [44] A. Weichsel, J.R. Gasdaska, G. Powis, W.R. Montfort, Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer, *Structure.* 4 (1996) 735–751.
- [45] G.C. Amorim, A.S. Pinheiro, L.E.S. Netto, A.P. Valente, F.C.L. Almeida, NMR solution structure of the reduced form of thioredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biomol. NMR.* 38 (2007) 99–104.
- [46] R. Bao, Y. Chen, Y. Tang, J. Janin, C. Zhou, Crystal structure of the yeast cytoplasmic thioredoxin Trx2, *PROTEINS Struct. Funct. Bioinforma.* 66 (2007) 246–249.
- [47] E. Krissinel, K. Henrick, Inference of macromolecular assemblies from crystalline state, *J. Mol. Biol.* 372 (2007) 774–797.

- [48] R. Friemann, H. Schmidt, S. Ramaswamy, M. Forstner, R.L. Krauth-Siegel, H. Eklund, Structure of thioredoxin from *Trypanosoma brucei brucei*, *FEBS Lett.* 554 (2003) 301–305.
- [49] D. Su, C. Berndt, D.E. Fomenko, A. Holmgren, V.N. Gladyshev, A conserved cis-proline precludes metal binding by the active site thiolates in members of the thioredoxin family of proteins, *Biochemistry.* 46 (2007) 6903–6910.
- [50] A. Iqbal, F. Gomes-Neto, C.A. Myiamoto, A.P. Valente, F.C.L. Almeida, Dissection of the water cavity of yeast thioredoxin 1: the effect of a hydrophobic residue in the cavity, *Biochemistry.* 54 (2015) 2429–2442.
- [51] J.D. Forman-Kay, G.M. Clore, P.T. Wingfield, A.M. Gronenborn, High-resolution three-dimensional structure of reduced recombinant human thioredoxin in solution, *Biochemistry.* 30 (1991) 2685–2698.
- [52] A.S. Pinheiro, G.C. Amorim, L.E.S. Netto, A.P. Valente, F.C.L. Almeida, 1 H, 13 C and 15 N Resonance Assignments for the Reduced Forms of Thioredoxin 1 and 2 from *S. cerevisiae*, *J. Biomol. NMR.* 36 (2006) 35.
- [53] B.W. Lennon, C.H. Williams, M.L. Ludwig, Twists in catalysis: alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase., *Science.* 289 (2000) 1190–4. doi:10.1126/science.289.5482.1190.
- [54] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680.
- [55] P. Gouet, E. Courcelle, D.I. Stuart, F. M toz, ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript., *Bioinformatics.* 15 (1999) 305–308.
- [56] W.L. DeLano, Pymol: An open-source molecular graphics tool, *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr.* 40 (2002) 82–92.
- [57] W. Im, D. Beglov, B. Roux, Continuum solvation model: computation of electrostatic forces from numerical solutions to the Poisson-Boltzmann equation, *Comput. Phys. Commun.* 111 (1998) 59–75.
- [58] T. Missall, J. Lodge . Thioredoxin Reductase Is Essential for Viability in the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell.* (2005) 4(2):487-489. doi:10.1128/EC.4.2.487-489.2005.

Table 1. Data collection and structure refinement statistics.

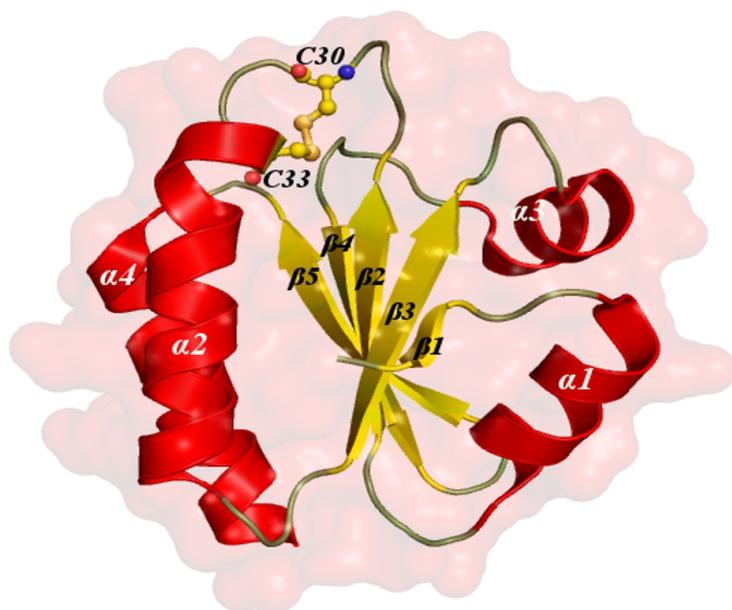
Crystal	<i>Cryptococcus</i> Oxidized -Trx1
Data collection	
Wavelength (Å)	1.2398
Space group	P6 ₄ 22
<i>Cell dimensions (Å)</i>	
A, B, C	110.706, 110.706, 91.761
α, β, γ	90.00, 90.00, 120.00
Resolution (Å) ^a	25.00-1.80 (1.86-1.80)
Mosaicity (°)	0.6
No. of total reflections	1.171.660
No. of unique reflections	29.599
Redundancy	37.1 (34.7)
Completeness (%)	100.0 (99.73)
R _{merge} (%) ^b	9.6 (58.1)
I/σ(I)	16.1 (6.19)
Refinement	
Resolution (Å)	25.00-1.80
<i>Model composition</i>	
No. of protein residues	105
No. of water molecules	347
Ligands	1 glycerol, 3 sulfate ions, 1 TRIS
Mean B-factor (Å ²): all atoms	37.27
R _{work} /R _{free}	0.155/0.198
<i>R.m.s. deviations</i>	
Bond lengths (Å)	0.023
Bond angles (°)	2.193
PDB code	5JY5

^a The values in parentheses refer to the highest resolution shell of 1.86 -1.80 Å. Highest resolution shell is shown in parentheses.

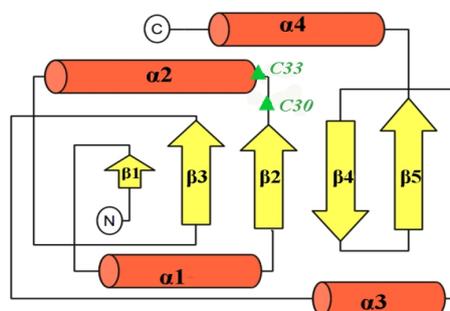
^b $R_{\text{merge}} = \sum |I_i - \langle I \rangle| / \sum I_i$, where I_i is the intensity of a reflection, and $\langle I \rangle$ is the average intensity of that reflection.

Figure 1

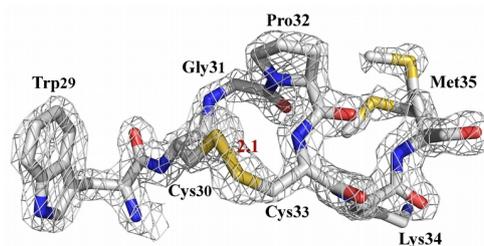
a



b



c



d

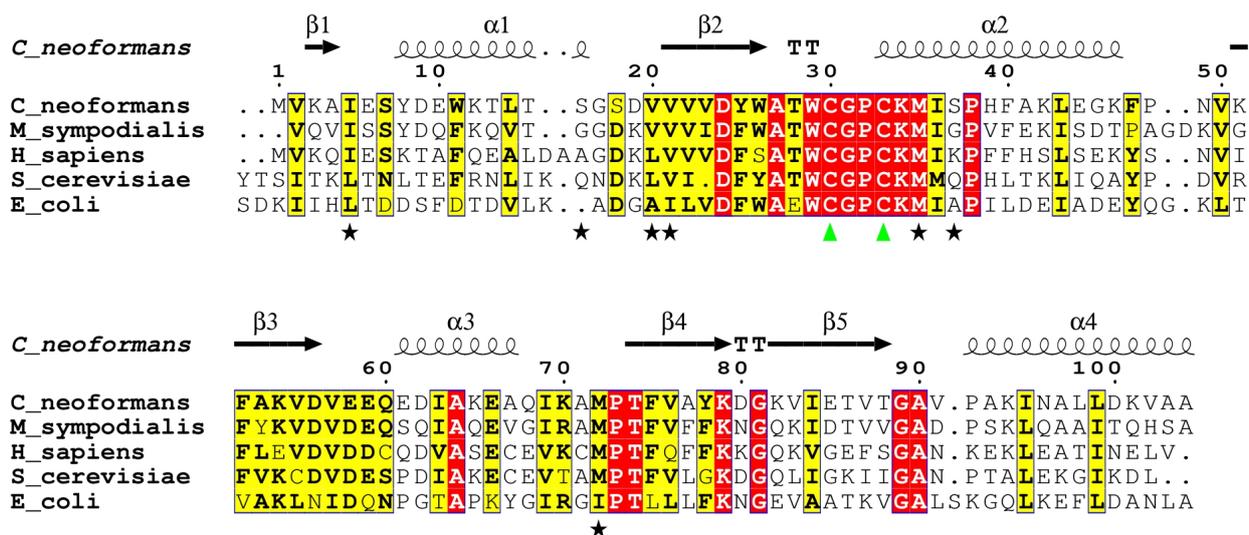


Figure 1. General architecture of CnTrx1. (a) Ribbon diagram of the overall structure of CnTrx1 with secondary structure elements labelled. Catalytic cysteines Cys³⁰ and Cys³³ are shown in the oxidized conformation observed in the crystal. All structure figures were made using PyMOL [56]. (b) Topological diagram of the CnTrx1 fold, showing the five-stranded mixed beta sheet sandwiched by four alpha helices. (c) Electron density $2|F_o| - |F_c|$ map, contoured at 1.0σ around the conserved active site region WCGPCKM motif of CnTrx1. The continuous electron density presents the disulfide bond between S γ atoms of Cys³⁰ and Cys³³. (d) Structure-based sequence alignment of CnTrx1 (5JY5) against sequences of other thioredoxin proteins of known structure from *M. sympodialis* (2J23), *S. cerevisiae* (2OE0), *H. Sapiens* (5DQY) and *E. coli* (1XOA). Absolutely conserved active-site cysteines are indicated with green triangle. Identical residues are in red boxes, similar residues are in yellow boxes. Secondary structure elements of the CnTrx1 are shown above the alignment. The stars below the residues indicate side chains that have double conformation. The alignment was performed using CLUSTAL W [54] and the figure was prepared with ESPript [55]. His-tag was removed from the sequence.

Figure 2

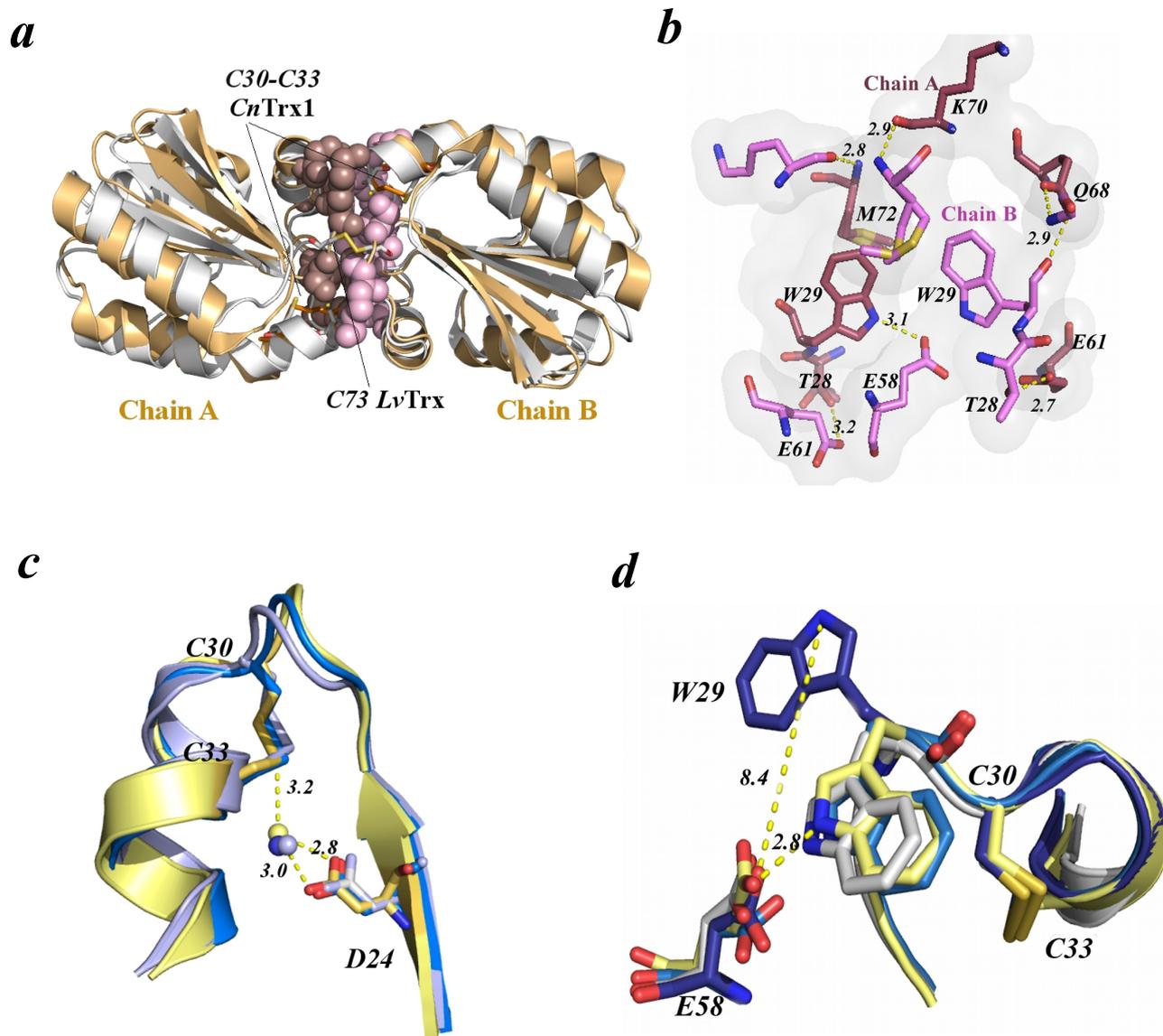


Figure 2. Molecular Interface of the crystallographic structure of *CnTrx1* and superposition of the active site motif from different thioredoxins. (a) Superposition of *C. neoformans* Trx1 (olive) on shrimp *L. vannamei* (*LvTrx*) (gray, PDB 4AJ6) showing the residues that make contact interface between monomers in *CnTrx1*, colored by chain Type: chain A (purple spheres) and chain B (violet spheres). *CnTrx1*_{ox} auxiliary complex highlighting the positions of Cys³⁰ and Cys³³ disulfide bond (orange) and the *LvTrx*_{red} dimer highlighting the positions of Cys³², Cys³⁵, and the Cys⁷³-Cys^{73'} intermolecular disulfide bond (yellow). (b) Front view of two monomers making up the intermolecular

interactions, showing the 8 residues: Thr²⁸, Trp²⁹, Gly³¹, Glu⁵⁸, Glu⁶¹, Gln⁶⁸, Lys⁷⁰ and Met⁷², involved in hydrogen bonds between inter-monomer interaction from *C. neoformans* Trx1. (c) *C. neoformans* (yellow, PDB 5JY5), *M. sympodialis* (Blue, PDB 2J23) and *S. cerevisiae* (Gray, PDB 2OE0) Trxs. The overlay shows the conserved hydrophobic area and the position of water molecules bound to Asp. Distances between internal water molecule with Asp²⁴ and Cys³³ of *C. neoformans* Trx1 are shown. (d) Superposition of the active site tryptophans from *C. neoformans* (yellow), *M. sympodialis* (gray), *S. cerevisiae* (light blue) and *T. brucei* (dark blue, PDB 1r26), shown in stick. The hydrogen bond between Glu⁵⁸-OE2 and Trp²⁹-NE1 of *C. neoformans* Trx1_{ox}, depicted by yellow dash, is present in all other Trxs shown except for *T. brucei* Trx_{red}, where Trp²⁹ occupies a different position. The figures were made using PyMOL.

Figure 3

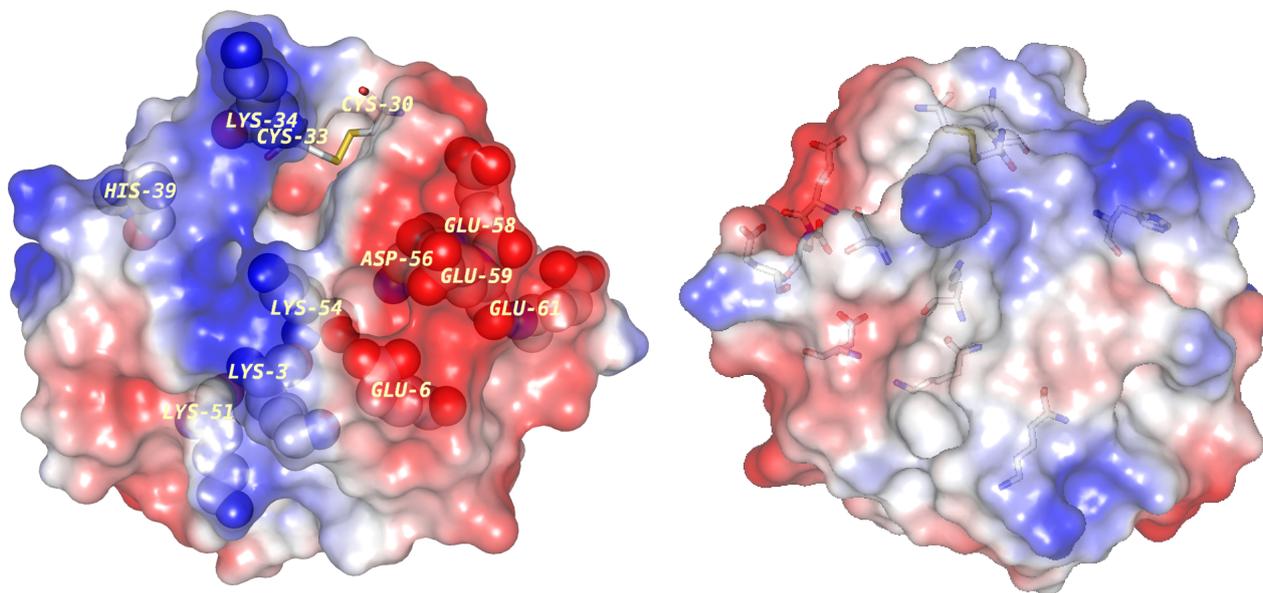
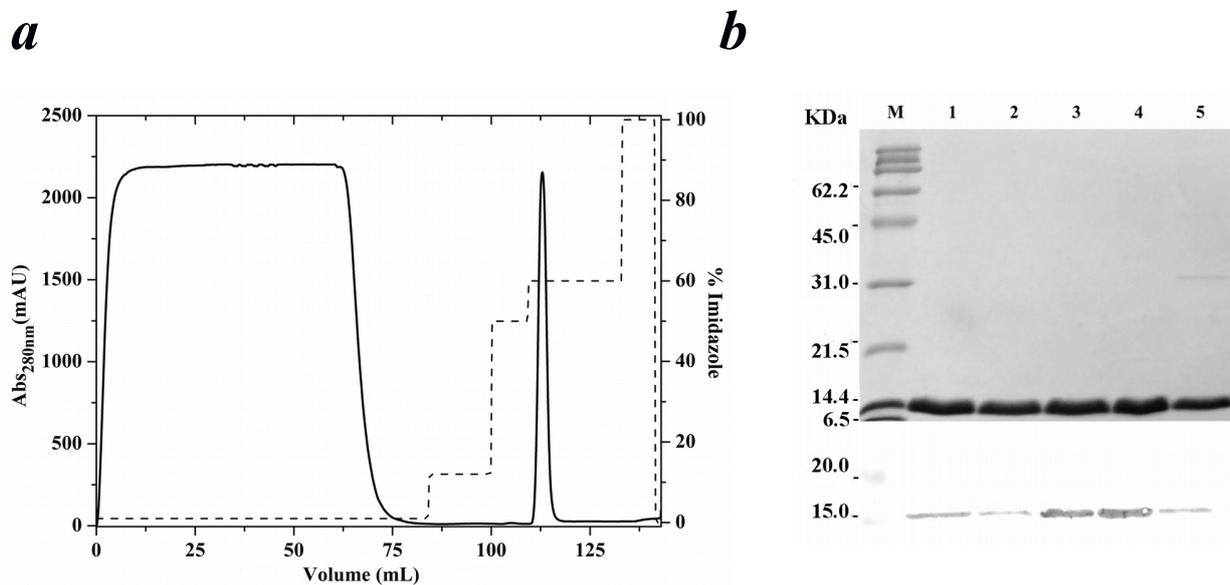


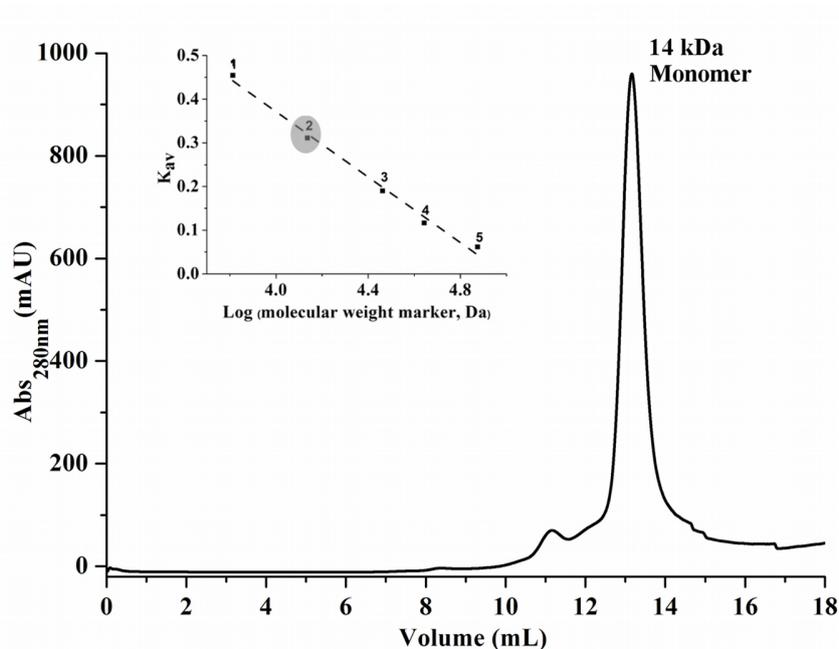
Figure 3. Stereo surface representation of *CnTrx1* monomer. Two 180° apart views of the *CnTrx1* electrostatic surface potentials (red, negative; blue, positive) as calculated with the GRASP Poisson-Boltzmann [57]. The disulfide bond (Cys³⁰-Cys³³) surface was omitted to facilitate viewing. The charged amino acid residues are pointed out by their type and sequence number.

Supplementary Material



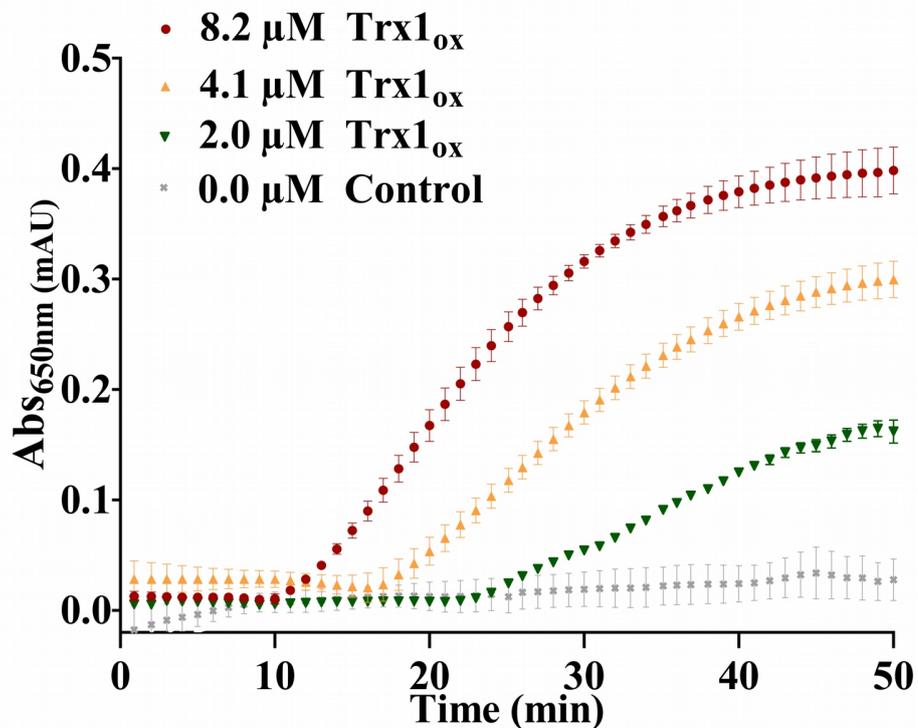
Supplementary Figure 1. Purification of recombinant *CnTrx1*. (a) The nickel affinity chromatogram profile corresponds to the purification of *CnTrx1* by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). The fraction was eluted from the IMAC column (packed with 1 mL of HisTrap) with 60% elution buffer using an ÄKTA express system (Dotted black line). (b) SDS-PAGE 15% and western-blot analysis of the soluble fraction of a cell extract of BL21 (λ DE3) pLysE containing the expression plasmid with the *CnTrx1*-His gene. Elution steps (1-5) with 300 mM imidazole (30 mM Tris-HCl pH 8.5, 300 mM NaCl). Molecular mass markers (M). The molecular mass of the complete recombinant protein 11.450 Da.

Supplementary Material



Supplementary Figure 2. Size exclusion chromatography of recombinant *CnTrx1*. The protein was loaded into a Superdex 75 10/300 column (GE), run in 30 mM Tris-HCl pH 8.5 and 300 mM NaCl, with a flow rate of 0.5 mL/min. The inset shows the column calibration curve. Calculated molecular weight is about 14 kDa for *CnTrx1*. The calibration curve was produced with the LMW Gel Filtration Calibration Kit (GE Healthcare) containing the following proteins as standards: (1) aprotinin, (2) ribonuclease A, (3) carbonic anhydrase, (4) ovalbumin and (5) conalbumin. The gray circle in the inset shows the position corresponding to the elution volume.

Supplementary Material



Supplementary Figure 3. Enzymatic activity of *Cn*Trx1. Oxidized thioredoxin 1 was assayed for its ability to reduce insulin in the presence or absence of DTT. The assay was performed at pH 7.0 in the presence of 1 mM DTT. Protein was used at a final concentration of 8.2, 4.1 and 2.0 μM and the activity was monitored as the increase of absorption at 650 nm due to precipitation of insulin monomers. The symbol and the error bars mean the average and standard deviation values ($n = 3$), respectively.

Supplementary Table 1. Percent sequence identity and Root-mean-square (rms) values comparisons of thioredoxins structures on 24 subject sequences.

Identity (%)/ RMS (Å)	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.	22.	23.	24.
<i>1. C. neoformans</i>	100/0																							
<i>2. M. Sympodialis</i>	52/0.6	100/0.																						
<i>3. Fungi ancestor</i>	50/0.6	53/0.6	100/0																					
<i>4. S. cerevisiae</i>	46/ 0.8	43/0.8	47/1.0	100/0																				
<i>5. D. melanogaster</i>	51/0.8	48/0.9	60/0.749/ 0.7	100/0																				
<i>6. L. vannamei</i>	47/0.9	50/0.9	59/0.7	53/0.8	59/0.4	100 /0																		
<i>7. A. gemmatalis</i>	46/0.9	48/0.7	57/0.7	49/0.7	61/0.6	58/0.6	100/0																	
<i>8. S. mansoni</i>	48/0.8	48/0.7	54/0.7	40/0.6	46/0.9	45/0.8	48/0.9	100/0																
<i>9. S. Japonicum</i>	39/1.4	45/1.0	53/1.0	41/0.8	42/1.3	42/1.0	43/1.2	65/0.6	100/0															
<i>10. F. hepatica</i>	43/0.6	38/0.6	52/0.5	41/0.7	46/0.7	46/0.5	47/0.6	46/0.6	50/1.1	100/0														
<i>11. H. sapiens</i>	43/1.2	46/0.8	62/0.5	45/1.1	50/0.6	51/0.5	47/0.5	47/0.6	45/0.7	48/0.3	100/0													
<i>12. C. reinhardtii</i>	49/0.6	50/0.6	57/0.5	44/0.8	44/0.6	52/0.6	37/0.7	51/0.5	46/1.0	47/0.6	47/0.5	100/0												
<i>13. A thaliana</i>	48/1.7	40/1.8	54/1.1	35/1.1	43/0.9	44/1.2	36/1.1	44/1.6	44/1.7	51/1.2	51/1.2	46/0.9	100/0											
<i>14. Oryza sativa</i>	48/1.9	45/1.8	50/1.6	41/1.8	41/2.0	40/1.8	43/1.9	45/1.1	45/1.8	53/1.0	44/1.8	49/1.8	60/2.3	100/0										
<i>15. H. vulgare</i>	40/0.7	43/0.6	47//0.6	46/0.6	46/0.7	47/0.9	38/0.8	51/0.4	46/0.6	48/0.6	46/0.6	44/0.8	58/0.9	59/1.4	100/0									
<i>16. E. histolytica</i>	44/0.8	39/0.6	41/0.6	36/0.9	44/0.6	43/0.7	45/0.7	45/0.8	45/1.2	52/0.5	40/0.7	41/0.6	34/1.0	42/1.5	38/0.6	100/0								
<i>17. P. falciparum</i>	38/0.7	41/0.7	55/0.4	38/1.1	43/0.7	46/0.7	43/0.7	44/0.7	43/1.0	40/0.7	40/0.5	46/0.4	44/1.3	44/1.7	38/0.6	38/0.8	100/0							
<i>18.T. brucei</i>	33/0.9	36/0.9	38/0.8	33/0.7	34/0.8	34/0.8	35/0.8	38/0.7	31/1.1	44/0.8	34/0.9	31/0.8	32/1.1	37/2.2	34/0.8	31/1.0	35/1.0	100/0						
<i>19. S. solfataricus</i>	38/0.7	41/0.4	47/0.4	38/0.9	40/0.5	45/0.5	36/0.8	43/0.6	39/1.0	41/0.6	35/0.7	41/0.5	44/0.6	38/1.9	37/0.6	33/0.6	43/0.5	27/1.0	100/0					
<i>20. S. tokodaii</i>	33/0.7	38/0.7	46/0.5	40/0.8	39/0.6	36/0.7	37/0.7	39/0.8	40/0.8	49/0.6	38/0.9	40/0.6	36/0.6	38/1.3	37/0.6	34/0.6	39/0.6	33/0.9	74/0.4	100/0				
<i>21A. dehalogenans</i>	41/1.3	41/1.0	40/0.9	28/0.8	40/1.0	37/1.0	36/0.9	39/1.0	38/1.0	39/0.8	35/1.0	43/1.1	38/1.4	40/1.9	41/0.7	36/0.9	39/1.0	28/1.2	39/0.6	36/0.8	100/0			
<i>22. A. acetii</i>	38/0.9	43/1.1	37/0.9	33/0.8	41/0.7	35/0.8	39/0.6	38/0.8	38/0.8	43/0.7	35/0.9	41/0.9	36/1.1	41/2.2	36/0.7	34/1.7	36/0.8	35/0.9	30/0.8	31/0.7	43/0.6	100/0		
<i>23. B. subtilis</i>	36/1.5	40/1.1	42/1.2	41/0.6	40/1.3	42/1.3	45/0.9	43/0.9	43/0.9	39/1.0	36/1.4	42/1.4	38/1.6	42/1.6	38/1.0	36/2.4	42/1.1	30/0.9	40/1.1	41/1.0	47/0.8	46/0.9	100/0	
<i>24. E. coli</i>	35/1.4	44/1.0	38/0.8	30/0.8	36/0.8	32/1.0	43/0.8	44/0.8	42/0.8	40/0.6	33/2.1	41/1.0	31/1.2	39/2.3	28/0.6	26/1.5	33/0.6	29/0.8	38/0.7	40/0.7	55/0.6	58/0.6	48/1.1	100/0

BLAST PDB, in 02-Sept-17.

Alignment scores > 70

- 6. *Litopenaeus vannamei*
- 7. *Anticarsia gemmatalis*
- 8. *Schistosoma mansoni*
- 9. *Schistosoma Japonicum*
- 10. *Fasciola hepatica*
- 12. *Chlamydomonas reinhardtii*
- 15. *Hordeum vulgare*
- 16. *Entamoeba histolytica*
- 17. *Plasmodium falciparum*
- 18. *Trypanosoma brucei*
- 19. *Sulfolobus Solfataricus*
- 20. *Sulfolobus tokodaii*
- 21. *Anaeromyxo acter dehalogenans*
- 22. *Acetobacter Aceti*
- 23. *Bacillus subtilis*

3. TIOREDOXINA REDUTASE (Trr)

As cisteínas da Trx são regeneradas à forma reduzida pela enzima Tio redoxina redutase (Trr) (Holmgren, 1985). A Trr pertence à família de flavoproteínas com atividade piridina nucleotídeo-dissulfeto oxidorredutase que utilizam o NADPH como fonte de equivalentes redutores. Tem como característica, a presença de um centro redox composto por um par de cisteínas além de um domínio protéico responsável pela ligação covalente a uma molécula de FAD. O fluxo de elétrons ocorre do NADPH para a molécula de FAD, para o centro redox e finalmente para o dissulfeto da tio redoxina (Williams, 1985). Em organismos L-Trr são conhecidas duas conformações distintas para a Trr: na conformação oxidada (FO) (Waksman *et al.*, 1994), o NADPH encontra-se espacialmente distante do FAD, e o FAD está orientado para a transferência de elétrons para o dissulfeto da Trr, e na conformação reduzida (FR) (Lennon *et al.*, 2000), onde os dois cofatores estão em íntimo contato e permite a redução do FAD pelo NADPH e a da tio redoxina pela tio redoxina redutase (**Figura 6**).

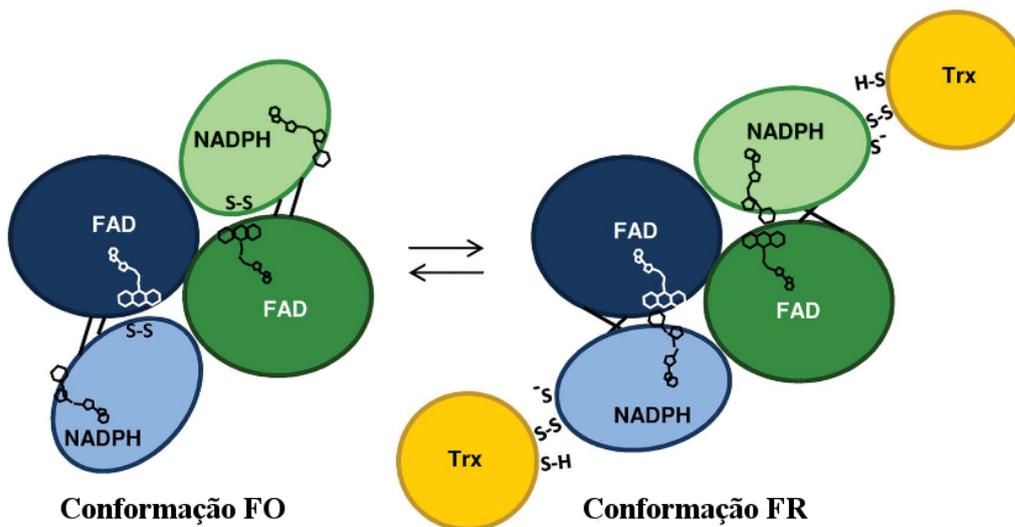


Figura 6. Esquema das conformações FO e FR, conforme proposto por Waksman *et al.*, (1994). As duas subunidades em cada dímero de Trr são coradas em azul e verde, respectivamente. Os óvalos coloridos mais escuros simbolizam os domínios do FAD, enquanto os óvalos coloridos mais claros mostram os domínios do NADPH. Os dissulfetos e os tióis são indicados como S-S e S-H, respectivamente. As linhas pretas que conectam os dois domínios simbolizam as folhas β antiparalelas em torno das quais ocorre uma rotação de 66° para conduzir a Trr da conformação FO para FR. Assim, o anel amina de nicotina está posicionado na proximidade do anel isoaloxazina da flavina e os ditióis são trazidos para a superfície da proteína, onde podem reduzir a Trx (mostrada em amarelo). Fonte: adaptado de Kirkensgaard *et al.*, (2009).

No intuito de compreender a estrutura terciária e secundária da *CnTrr1*, realizamos experimentos de fluorescência e dicroísmo circular que permitiram observar as mudanças conformacionais, interações e/ou deslocamentos na emissão fluorescente e obter informações acerca do

ambiente dos triptofanos e cofatores envolvidos. Além disso, foi avaliada a estabilidade da proteína em diferentes condições, como em variações de temperatura e força iônica. Posteriormente a exclusão molecular e o DLS foram aplicados para caracterizar o estado de oligomerização da proteína em solução. Com a cristalografia de raios X, foi possível determinar a estrutura 3D da *CnTrr1* na conformação FO fornecendo as coordenadas em nível atômico (código PDB 5W4C), se tornando a primeira estrutura tridimensional de uma Trr de um fungo patogênico humano.

Até o momento, trinta e cinco estruturas de Trr de baixa massa molecular foram depositadas no PDB (<http://www.rcsb.org/>, dados atualizados 30/01/2018). Dessas, 5 são estruturas de Trr de *E. coli*, 26 de outras Trr bacterianas, 1 Trr de arquea, 2 Trr de leveduras, e apenas uma Trr em plantas. Todas as estruturas depositadas, com exceção da Trr-NADPH em complexo com Trx (1F6M) em *E. coli*, e a recentemente depositada Trr-NADP de *Vibrio vulnificus* (5USX), revelam Trr na conformação FO.

Adicionalmente, com a elucidação estrutural da proteína Trr1_{ox} e com o conhecimento dos arranjos atômicos, neste capítulo foi feita a modelagem molecular da proteína reduzida (FR) e a análise *in silico* de possíveis ligantes, que visam o desenvolvimento de novos compostos antifúngicos. As pequenas moléculas selecionadas por varredura virtual em quimiotecas que mostraram-se eficientes na inibição do crescimento do fungo patogênico *C. neoformans* (tema que será abordado no capítulo seguinte), foram ancoradas no local de ligação da proteína na conformação oxidada (5W4C) e no modelo na conformação reduzida, para avaliar as interações e afinidades mais favoráveis destes ligantes no sítio catalítico e em regiões importantes conservadas para a atividade catalítica.

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.2 Síntese química do gene *TRR1* para expressão heteróloga

Com a finalidade de otimizar o processo de expressão heteróloga da proteína, o gene alvo *TRR1* (GeneBank: CNAG_05847) de *C. neoformans* var. *grubii* H99 foi sintetizado quimicamente pela empresa Epoch Biolabs. O gene foi desenhado com sítios de restrição nas extremidades para as enzimas *NdeI* e *XhoI* e, selecionados os códons preferenciais (codon usage) para *E. coli*. O gene foi clonado no vetor de expressão bacteriano pET21a (Novagen) sob o controle transcricional da T7 RNA polimerase.

3.1.3 Transformação de cepas de *Escherichia coli*

A transformação por choque térmico foi iniciada com a adição de 20 ng do sistema de ligação (vetor pET21a::inserto), técnica descrita por Sambrook e cols., (2001). Foram plaqueados 20 µL e 50 µL de células transformadas em meio LB ágar (triptona – 1 g, extrato de levedura – 0,5 g, NaCl – 1g e ágar -2g, em 100 mL, pH 7,0) acrescido de antibiótico (Amp). Para garantir a obtenção de clones transformados, o volume restante foi centrifugado a 13.000 ×g, por 2 min e descartado 800 µL do sobrenadante. As células foram ressuspensas e 20 µL foram plaqueados em meio LB ágar. As placas foram incubadas por 16 h a 37 °C (Joseph Sambrook e Russell, 2001).

3.1.4 Expressão e purificação da proteína recombinante Trr1 de *C. neoformans*.

A clonagem para expressão segue a metodologia utilizada durante a dissertação de mestrado de Bravo-Chaucanés *et al.*, (2014) (dados não publicados). Uma vez que os transformantes foram obtidos, foram inoculados 12,5 mL de pré-inóculo em 250 mL de meio LB contendo o devido antibiótico. A proteína recombinante *CnTrr1* foi suplementada com ampicilina (100 µg/mL), 0,5% de glicose e 20 µM de FAD. Após a indução da expressão do gene por 6 h com 1 mM de IPTG (densidade ótica de 0,6 a 600 nm) a 37 °C sob agitação de 250 rpm, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em tampão de lise (Tris HCl 30 mM pH 8,5; NaCl 300 mM e imidazol 10 mM). Ao *pellet* ressuspenso foi adicionado 0,1 mM de FAD (para saturar a enzima). Para a extração da proteína as células bacterianas foram rompidas com uso do aparelho Vibra Cell (Sonics), utilizando uma amplitude de 50%, aplicando 10 pulsos de 10 s. com intervalos de 50 s. Após a sonicação, o extrato foi centrifugado por 40 min. 4 °C, a 9000 ×g. A partir dos extratos bacterianos, a proteína recombinante foi purificada em larga escala em duas etapas, utilizando duas técnicas cromatográficas distintas. A primeira metodologia utilizada foi a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, e a segunda mediante exclusão molecular

conforme descrito nos itens 3.1.5 e 3.1.6, respectivamente. Todas foram realizadas no equipamento ÄKTA PURIFIER.

3.1.5 Cromatografia por afinidade a íons imobilizados (IMAC)

A escolha do método de purificação da proteína expressa com o vetor pET21a foi baseado na expressão desta proteína recombinante fusionada a seis resíduos de histidina ao C-terminal. As histidinas possuem afinidade a metais bivalentes como Ni^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} , por isso foi utilizada uma resina cromatográfica Sepharose contendo íons de Ni ligados (GE Healthcare) para a purificação. Para a preparação da coluna de cromatografia de afinidade HiTrap™ chelating HP de 1 mL, foi realizada uma lavagem com solução A (tampão de ligação), contendo Tris HCl 30 mM pH 8,5, NaCl 300 mM e Imidazol 10 mM, seguida de lavagens de 5 volumes de coluna (VC) com essa solução. A coluna foi carregada com íons níquel após a aplicação de NiSO_4 0,1 M e para a retirada do excesso de íons, a coluna foi lavada com 5 VC de H_2O Milli-Q. O material obtido após a lise celular foi filtrado com uma membrana de 0,45 μm e foi injetado à coluna que foi pré-equilibrada com solução A com um fluxo de 1 mL/min em 5 VC. As etapas de lavagem e eluição foram executadas com o uso da bomba B do equipamento que injetava uma solução denominada tampão de eluição, contendo Tris HCl 30 mM pH 8,5, NaCl 300 mM e imidazol 500 mM. No procedimento de purificação utilizou-se o sistema de purificação ÄKTA FPLC, software UNICORN 5.1. A cromatografia foi realizada com um gradiente linear de (2-100%) de tampão de eluição B, em uma extensão de aproximadamente 70 mL. O perfil cromatográfico foi acompanhado por leituras de absorbância em 280 nm e amostras das frações coletadas foram verificadas por SDS-PAGE (Sambrook *et al.*, 1989) e coradas com *Coomassie Blue*, por 1 h, sob agitação. As frações que apresentaram a proteína de fusão recombinante foram selecionadas para o segundo passo cromatográfico.

3.1.6 Cromatografia de exclusão molecular (SEC)

O *pool* das amostras obtidas após a primeira etapa de purificação foi concentrado por filtração em Amicon (Millipore) com poros de 10 kDa, centrifugadas a 9000 $\times g$ a 4 °C até atingir aproximadamente o volume de 500 μL . A coluna cromatográfica Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) utilizada nessa etapa de purificação foi ambientada com tampão Tris HCl 30 mM pH 8,5 e NaCl 300 mM e o fluxo utilizado para eluição da proteína foi de 0,5 mL/min. Utilizou-se como padrões de massa molecular, as proteínas: aprotinina (6,5 kDa), ribonuclease A (13,7 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ovalbumina (44 kDa) e conalbumina (75 kDa). Azul de dextrano 2000 foi empregado para determinar o volume morto da coluna (*Gel Filtration Calibration Kit low molecular weight*, GE

Healthcare). Foram coletadas apenas as frações que levaram à alteração do pico de absorvância de UV₂₈₀, as quais foram armazenadas a -4 °C.

3.1.7 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) da proteína *CnTrr1*

DLS fornece informações sobre o raio hidrodinâmico da proteína e monodispersividade populacional (homogeneidade estrutural) (Murphy, 1997). As análises foram realizadas a 18 °C, no equipamento Zetasizer Nano ZS90, Malvern. As amostras resultantes da purificação por cromatografia de afinidade, foram centrifugadas por 5 min a 13.000 ×g e os sobrenadantes foram aplicados em cubeta de quartzo para a realização de medidas de DLS. Foram utilizados 500 µL de amostra em uma concentração 0,1-0,2 mg/mL em Tris-HCl em diferentes faixas de pH. O software Zetasizer 6.12 foi utilizado no processamento dos dados.

3.1.8 Determinação da concentração proteica

Para a quantificação da proteína recombinante utilizou-se o método baseado na leitura de absorvância direta da proteína a 280 nm e do coeficiente de extinção para a predição da massa molecular da proteína. A concentração da proteína foi obtida pela equação de Lambert-Beer: $A = \epsilon \times l \times C$. Onde, A é a leitura de absorvância; ϵ é o coeficiente de extensão molar; l é o comprimento do caminho ótico em centímetros; C é a concentração em mol/L. A concentração molar determinada foi multiplicada pelo fator de diluição. O valor calculado de ϵ para *CnTrr1* foi 33015 M⁻¹ cm⁻¹, com um peso molecular de 39868,7; esses dados foram determinados a partir da sequência de aminoácidos da proteína pela ferramenta ProtParam do *site* Expasy (<http://web.expasy.org/protparam/>).

3.1.9 Análise da estrutura terciária da proteína *CnTrr1* por espectrofluorimetria

Mudanças conformacionais da proteína *CnTrr1* (0,045 mg/mL) foram avaliadas por medidas de emissão de fluorescência do resíduo triptofano em um espectrofluorímetro Jasco (FP6500, Japão), acoplado a um controlador de temperatura do tipo Peltier (Jasco ETC-273T Japão). Os ensaios foram realizados em diferentes pHs, utilizando tampão citrato de sódio 5 mM (pH 4,0 4,4, 5,0 e 6,0) e hepes 5 mM (pH 7,0 8,0 e 9,0). Para os ensaios todos os tampões foram filtrados em membrana de celulose com poro de 0,2 µm. Os resíduos de triptofano foram excitados a 295 nm, com abertura dos *slits* de excitação e emissão em 5 nm e 10 nm, respectivamente. Os espectros de emissão foram coletados a 25 °C, em comprimentos de onda de 300 a 570 nm. Os dados foram analisados usando o programa Graphpad Prism® (version 6.01, 2000).

A atividade de oxidase da proteína *CnTrr1* (0,045 mg/mL) foi determinada pelo consumo e ligação do NADPH, acompanhado pela alteração da intensidade da banda de emissão do triptofano em

decorrência desta ligação. O ensaio de atenuação foi conduzido a 340 nm, utilizando tampão citrato de sódio 5 mM (pH 4,0 4,4, 5,0 e 6,0) e hepes 5 mM (pH 7,0 8,0 e 9,0), sob concentrações crescentes de NADPH (26-600 μ M). Os dados de atenuação de fluorescência foram utilizados para cálculo da constante de Stern-Volmer (K_{sv}), conforme equação 1:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] \text{ ou } K_{sv} = ((F_0/F) - 1)/[Q] \quad (\text{eq. 1})$$

Onde F_0 e F são as intensidades relativas de fluorescência na ausência e na presença do supressor, respectivamente, $[Q]$ é a concentração molar do supressor e K_{sv} é a constante de supressão de Stern–Volmer. A curva de saturação de ligação do NADPH à *CnTrr1* foi ajustada usando método de regressão não-linear disponível no programa GraphPad Prism®. Os dados obtidos pelo ensaio de saturação foram utilizados para calcular os parâmetros B_{max} (ligação específica máxima) e K_d (constante de dissociação). Além da constante de K_{sv} , também foi calculada a constante de associação (K_a) entre *CnTrr1* e NADPH, conforme mostrado na equação 2:

$$\text{Log } (F_0-F)/F = K_a + n\text{Log } [Q] \quad (\text{eq. 2})$$

Onde K_a é a constante de ligação relacionada à afinidade entre a proteína e o ligante, e n é o número de sítios de ligação do complexo formado (Mathavan *et al.*, 2015). Esses dados foram calculados a partir da curva ajustada por regressão linear, usando GraphPad Prism (version 6.01, 2000).

3.1.10 Análise da estrutura secundária da proteína *CnTrr1* por dicroísmo circular

A estrutura secundária da proteína *CnTrr1* foi caracterizada por ensaios de dicroísmo circular (DC). Os ensaios foram realizados utilizando o espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Instruments, Japão), com temperatura controlada por um sistema Peltier (Jasco Analytical Instruments), acoplado a um banho termostático. Os espectros dicroicos foram obtidos em região distante do ultravioleta (UV) (190-260 nm) a 25 °C. Os ensaios foram conduzidos em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico. A proteína (0,15 mg/mL) foi diluída em tampão acetato de sódio 2 mM (pH 4,0 e 5,0) e tris-HCl 2 mM (pH 7,0 e 9,0), na ausência e presença do NADPH (26 e 56 μ M). Três espectros dicroicos consecutivos foram acumulados e a média foi subtraída do espectro de contribuição dos tampões. As leituras foram realizadas a cada 0,1 nm e as elipticidades foram convertidas para elipticidade molar ($[\theta]M$) com base na massa molecular de 115 Da por resíduo (Adler *et al.*, 1973).

3.1.11 Ensaio de termoestabilidade da proteína *CnTrr1* por dicroísmo circular

A estabilidade estrutural da proteína foi caracterizada mediante variação de temperatura. Portanto, curvas de desnaturação da proteína foram obtidas nos pHs 4,0 5,0, 7,0 ou 9,0, na ausência e presença do NADPH (26 e 56 μ M) com temperatura variando entre 25 e 95°C. As curvas foram obtidas

no comprimento de onda de 222 nm e, simultaneamente, três espectros dicróicos foram coletados em região distante da UV (190-260 nm) a cada 10 °C. As curvas obtidas na desnaturação térmica foram normalizadas e expressas quanto a fração desdobrada da proteína (f_U) versus variação da temperatura (°C), de acordo com a equação 3. Para obter os dados de estabilidade da proteína foram utilizadas as equações listadas abaixo logo abaixo (Pace, 1997). Os parâmetros termodinâmicos (entalpia [ΔH], entropia [ΔS], a temperatura de fusão (T_m) e a energia livre de Gibbs a 25 °C [ΔG^{25}]) foram calculadas a partir da aproximação de van't Hoff (eq. 3-6; e eq. 7).

$$f_U = (S_n - [\theta]M) / (S_n - S_u) \quad (\text{eq. 3})$$

$$K_{\text{eq}} = f_U / (1 - f_U) \quad (\text{eq. 4})$$

$$\Delta G = -R T \ln K_{\text{eq}} \quad (\text{eq. 5})$$

$$R \ln K_{\text{eq}} = -\Delta H (1/T) + \Delta S \quad (\text{eq. 6})$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{eq. 7})$$

Onde, S_n e S_u representam fração nativa e desnaturada, respectivamente obtidas por regressão linear; R é a constante universal dos gases ($1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), e T é a temperatura em Kelvin (K). A temperatura de fusão (T_m) corresponde ao ponto de inflexão da curva de desnaturação térmica. Este dado foi calculado a partir do ajuste não linear das curvas de desnaturação obtidas e também por meio do gráfico ΔG vs temperatura, no qual T_m corresponde à temperatura em $\Delta G = 0$ ($\Delta G = 0 = \Delta H - T \Delta S$). Todos os parâmetros calculados foram estimados utilizando o software Origin 8.0 (OriginLab, Northampton, USA).

3.1.12 Cristalização da proteína recombinante CnTrr1

Para a realização do experimento de cristalização, CnTrr1 foi dialisada em tampão Tris HCl 10 mM pH 8,5 e NaCl 30 mM. CnTrr1 foi inicialmente concentrada até 10 mg/mL e logo após, foi incubada com 0,2 mM de FAD por 30 min e finalmente concentrada até ~35 mg/mL. O ajuste da concentração foi feito usando o concentrador Ultra-Amicon (Merck). Antes do início dos ensaios, a proteína foi mantida em banho de gelo e depois centrifugada por 15 min a $12000 \times g$, sendo utilizado o sobrenadante. A triagem para obter condições iniciais de cristalização foi realizada, utilizando o robô MOSQUITO (TTP LabTech) em placas de 96 poços. 0,2 μL da solução de proteína foram misturados com 0,2 μL da respectiva solução precipitante para cada um dos 96 poços, o reservatório foi preenchido com 100 μL do agente precipitante. Os *screens* utilizados foram os kits *Crystal Screen I e II* (Hampton Research) e os Kits PACT *premier* HT-96 e JCSG-*plus* HT-96 (Molecular Dimensions). Cristais de diferentes condições de cristalização foram posteriormente otimizados em placas de 24 poços usando

o método de difusão de vapor em gota sentada, contendo 1 μL da proteína misturada com 1 μL de solução do reservatório. Os experimentos de cristalização foram determinados em sala com controle de temperatura a 20 °C.

Adicionalmente, foi utilizada a técnica de *seeding* (D'Arcy *et al.*, 2007). Sendo assim, uma solução estoque (*seedstock*) foi preparada com cristais iniciais (em forma de agulha) triturados na solução de cristalização (50 μL), utilizando um tubo *ependorf* com uma microesfera de vidro; a mistura foi agitada em vórtex por 10 min. Esta solução estoque foi diluída 10x, 10²x, 10³x e 10⁴x. Gotas contendo um volume de 1,5 μL da solução de cristalização e 0,3 μL do *seed* (soluções com sementes) foram feitas e depois, 1,2 μL da proteína foi adicionada às novas gotas.

3.1.13 Coleta de dados de difração e determinação das fases

Os cristais foram levados à linha de cristalografia de proteínas do LNLS em Campinas (São Paulo), e submetidos a experimento de difração de raios X. Os cristais obtidos foram resfriados a 100 K com fluxo de nitrogênio gasoso. O detector Pilatus 2M coletou informações da intensidade e da direção dos feixes difratados. Utilizando o programa HKL2000 (Otwinowski e Minor, 1997) foi feita a indexação e integração dos dados, para determinar os parâmetros da célula unitária e o grupo espacial. Em seguida foi realizado o agrupamento, escalonamento e a promediação das reflexões equivalentes com o programa *DENZO/SCALEPACK* do pacote do HKL2000 (Evans, 1997). A resolução da estrutura, foi realizada através do método de substituição molecular (MR), utilizando o programa PHASER (McCoy *et al.*, 2007). A estrutura cristalina de Trr1 de *S. cerevisiae* (código PDB: 3ITJ) (Oliveira *et al.*, 2010), foi usada como modelo de busca.

3.1.14 Refinamento e validação da estrutura cristalográfica de *CnTrr1*

O refinamento foi feito com os programas REFMAC (Murshudov *et al.*, 1997) e Phenix.refine (Afonine *et al.*, 2005). O programa Coot v.0.8.2 (Emsley e Cowtan, 2004) foi utilizado para inspeção visual, substituição de aminoácidos e ajuste da molécula ao mapa de densidade eletrônica. Inicialmente, realizou-se um refinamento de corpo rígido, seguido de um refinamento com restrições, e TLS (translação, libração, parafuso) onde foram avaliados os valores de R_{free} e R_{factor} . Após vários ciclos de refinamento, as moléculas de água foram adicionadas com o programa REFMAC do pacote CCP4. O acompanhamento da qualidade deste processo é feito por meio do cálculo do fator R. Como R pode ser minimizado artificialmente e levando em consideração a redundância dos dados de raios X, uma pequena porcentagem das reflexões são excluídas do refinamento e utilizadas como um conjunto de teste no cálculo de um novo fator R chamado R_{free} , que é isento de minimização artificial (*overfitting*).

A qualidade estereoquímica do modelo foi avaliada utilizando-se os programas Procheck (Laskowski *et al.*, 1993) e Molprobity (Chen *et al.*, 2010), bem como os gráficos de Ramachandran (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) e o servidor *wwPDB validation software*. Todas as representações gráficas apresentadas neste trabalho foram geradas com a utilização do programa PyMOL1.7.2.1 (<http://www.pymol.org>). *CnTrr1* foi depositada no *Protein Data Bank* (www.rcsb.org) sobre o código 5W4C.

3.1.15 Testes *in silico*

Ligantes

Inicialmente, os ligantes foram obtidos por colaboração com o Prof. Dr Bernard Maigret do grupo LORIA, na Universidade Henri Poincaré, Nancy, França; que na ausência da estrutura 3D resolvida experimentalmente para a proteína tioredoxina redutase, utilizou métodos computacionais para prever por modelagem molecular por homologia a estrutura da Trr1 de *C. neoformans*. Após a construção, refinamento e avaliação do modelo, pequenas moléculas (*small molecules*) que possam bloquear a ação da proteína alvo (modelo de *CnTrr1*) foram selecionadas pela varredura virtual. Posteriormente, com a análise da distribuição dos scores, ou seja, as afinidades de ligação previstas, o grupo do Professor Maigret identificou 19 *small molecules* (compostos candidatos ou *hits*). As moléculas selecionadas por varredura virtual do banco de dados da *Life Chemicals* (<http://www.lifechemicals.com/>) foram adquiridas e testadas no nosso grupo de pesquisa. Das 19, 2 moléculas apresentaram atividade antifúngica *in vitro* contra *C. neoformans* (H99) (Capítulo II), chamadas de: molécula 3 e molécula 14, que por razões de patenteamento não serão aqui mostradas.

Preparação da proteína alvo

A estrutura cristalográfica de *CnTrr1* resolvida neste trabalho foi utilizada nos protocolos de *docking* e dinâmica molecular (DM). Esta proteína apresenta um homodímero interagindo com o cofator FAD em cada subunidade, e apresenta o sítio ativo oxidado (conformação FO).

Modelagem da conformação reduzida (FR)

Para a criação do modelo na forma reduzida (FR) de *CnTrr1*, usou-se o domínio do FAD na conformação oxidada, em quanto que o domínio do NADPH de *CnTrr1* foi modelado usando as coordenadas do domínio NADPH de *EcTrxR* (*E. coli*) que encontra-se na conformação reduzida complexada à tioredoxina e ao análogo de NADP⁺, AADP⁺ (PDB 1F6M). Posteriormente, os domínios de ligação do NADPH foram superpostos. Assim, o domínio do FAD da *CnTrr1* e o domínio do

NADPH da proteína homóloga foram dispostos usando o software MODELLER (Eswar *et al.*, 2001) para modelagem por homologia, 5 modelos na conformação FR foram obtidos, sendo que o melhor modelo foi escolhido de acordo com a qualidade estereoquímica da estrutura usando o gráficos de Ramachandran do software RAMPAGE, e o servidor on-line Swiss Model para a validação dos modelos gerados, que analisa vários padrões estatísticos como as características geométricas do modelo que são comparadas com distribuições estatísticas obtidas a partir de estruturas experimentais (Biasini *et al.*, 2014).

Docking dos ligantes

Dois tipos de *docking* foram feitos: um com a estrutura 3D da *CnTrr1* na conformação oxidada e outro com o modelo na conformação reduzida. Além disso, para cada conformação foram realizados *docking* da proteína rígida na presença e ausência do cofator FAD, onde, somente os compostos inibitórios tiveram a possibilidade de fazer a rotação dos ângulos torcionais entre suas ligações.

O programa utilizado para as análises de *docking* foi o AutoDock Vina (Trott e Olson, 2010). Antes de se realizar esse experimento *in silico* preparou-se tanto a proteína quanto o ligante para a corrida, para isso utilizou-se o pacote MGLTools. Para preparar as coordenadas, foram retiradas todas as moléculas de água e ligantes da estrutura da proteína, e adicionaram-se os hidrogênios polares que não estavam presentes no arquivo do PDB. A seguir, definiu-se a área em que foi feita a procura das poses (*grid box*), em outras palavras, a região em que o ligante deve interagir (na conformação FO: size_x =30, size_y = 22, size_z = 28; e na conformação FR: size_x =30, size_y = 30, size_z = 38), a qual compreende toda a região do sítio ativo. Após isso, realizou-se a preparação do ligante, ao carregar o composto no programa automaticamente é detectada a carga do ligante, além disso, cada átomo presente na molécula é classificado e as ligações passíveis de rotação detectadas. Para realização dos experimentos selecionou-se um valor de *exhaustiveness* fixa para cada tipo de *docking*, 200 para *docking* com a proteína rígida. As análises foram feitas utilizando os programas Pymol para gerar as imagens, os cálculos do RMSD foram feitos utilizando o programa VMD e imagens com ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas usando o LigPlot+.

Complexo CnTrr1-CnTrx1 por docking

O modelo na conformação FR, serviu para ancorar a Trx1 de *C. neoformans* (5JY5). O servidor ClusPro 2.0 *protein-protein docking* (Kozakov *et al.*, 2017) é atualmente uma ferramenta utilizada no desafio de prever as interações entre proteínas. O servidor realizou o *docking* de corpo rígido e selecionou 20 complexos energeticamente favoráveis, após a realização de movimentos de rotação e

translação da proteína (ligante) em relação a o receptor, mantido fixo. Para selecionar o melhor modelo, foi construído um segundo modelo do complexo Trr1-Trx1 através da sobreposição de *CnTrr1* sobre o complexo Trx de *E. coli* (PDB: 1F6M). Os critérios utilizados para seleção do complexo foram distancia entre o ligante e o receptor, e direção correta do *docking* baseada no reconhecimento do substrato (Trx de *E. coli*). Por médio da comparação dos modelos, selecionamos o melhor complexo entre os 20 *clusters* indicados pelo programa.

Dinâmica molecular (DM)

As coordenadas da conformação reduzida da *CnTrr1* foram submetidas à dinâmica molecular (DM) utilizando o programa Gromacs (Pronk *et al.*, 2013), versão 5.1, com o campo de força gromos 54A7 (Schmid *et al.*, 2011). A estrutura submetida a dinâmica contém um total de 333 aminoácidos, com ausência de 13 resíduos na região N-terminal (não foram identificados na estrutura oxidada) e 22 resíduos correspondentes ao *loop* extra na região C-terminal. Executou-se duas dinâmicas diferentes, primeiramente foi realizado um experimento com a *CnTrr1* (FR) retirando o cofator FAD (100 ns), em seguida os compostos foram testados na pose selecionada pelo *docking* (ocupando a posição do sítio ativo e/ou cofatores). A segunda dinâmica foi realizada com o cofator FAD, os parâmetros do campo de força do FAD foram obtidas da tese doutoral de Feenstra, (2002). Em seguida, as cargas atômicas foram obtidos do arquivo de topologia criado no servidor PRODRG (Schuttelkopf *et al.*, 2004). Após a adição das cargas com os dados já previamente parametrizados, foi montado o cofator com a estrutura e submetidos à DM por 100 ns.

A fim de obter um modelo com um arranjo mais preciso e com um melhor relaxamento, a proteína (com e sem o FAD) foi inicialmente solvatada em uma caixa de moléculas de água, um dodecaedro com a distância de 0,7 nm entre o soluto e as laterais da caixa, variando em torno de ~73000 moléculas de solvente por DM. Foi realizada a adição de íons, em geral 5 íons de Na⁺. As simulações de dinâmica molecular foram realizadas em três etapas: minimização da energia, equilíbrio do sistema e dinâmica molecular. O sistema foi inicialmente minimizado energeticamente para localizar as conformações de menor energia com o algoritmo *steepest descent*. Durante o equilíbrio do sistema, a simulação foi conduzida até que as propriedades do sistema estivessem estáveis. Duas etapas de equilíbrio foram feitas, a primeira relacionada à temperatura (100 ps), na qual o sistema alcançou o valor de 300 K e ficou estável. Em seguida, foi feita a segunda etapa de equilíbrio, a de pressão (100 ps). A etapa da DM foi feita logo depois utilizando aceleradores de GPU. Os gráficos de rmsd foram gerados por rotinas internas do Gromacs. Todos os testes de modelagem, *docking* e DM contaram com

o suporte do estudante de doutorado Jônatas Cunha Lima (UnB-Brasília). Na **Figura 7** está resumido o processo que foi usado para os estudos *in silico*.

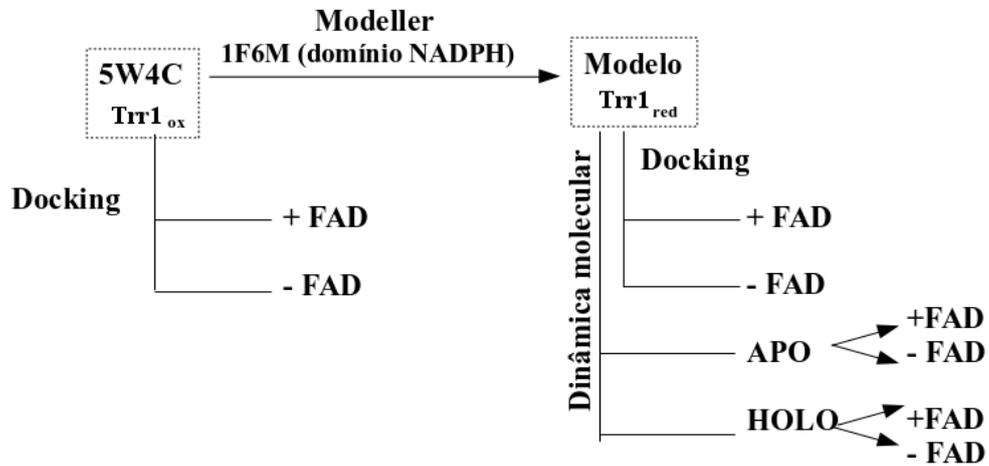


Figura 7. Resumo dos ensaios *in silico* realizados em Trr1_{ox} e no modelo Trr1_{red}. +FAD: docking com o cofator, -FAD: docking sem o cofator. APO: DM de CnTrr1 sem a parametrização do FAD, HOLO: DM de CnTrr1 com a parametrização do FAD.

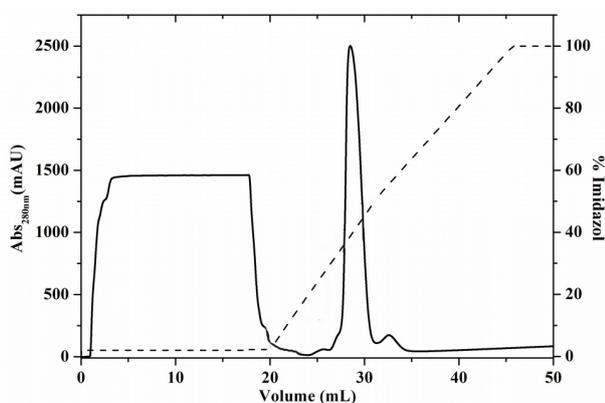
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos de expressão heteróloga em larga escala, e os testes de atividade enzimática da proteína recombinante foram padronizados durante a etapa de mestrado por Bravo-Chaucanés (2014). A melhor condição para produção da proteína recombinante solúvel foi obtida expressando *CnTrr1* na linhagem de *E. coli* BL21(DE3) com IPTG 1 mM, 0,5% de glicose e 20 μ M de FAD por 6 h a 37 °C em meio LB.

3.2.1 Cromatografia de afinidade da proteína recombinante *CnTrr1*

As células expressas provenientes de 2 L de meio LB foram ressuspensas em tampão de lise. O sobrenadante obtido foi aplicado em uma coluna de cromatografia de afinidade e a eluição foi realizada mediante a aplicação de gradiente linear de imidazol. O pico de eluição da proteína foi visualizado no perfil cromatográfico quando o imidazol foi injetado em uma concentração de ~200 mM. As frações correspondentes ao pico foram confirmadas por análise eletroforética em gel SDS-PAGE 12% como mostrado na **Figura 8**, que revelou uma banda proteica na altura de 39 kDa, que corresponde à massa molecular esperada. Os resultados indicam que a proteína foi produzida na forma solúvel, e foi purificada com sucesso apresentando uma cor ligeiramente amarela, que é indicativo da flavina ligada.

A.



B.

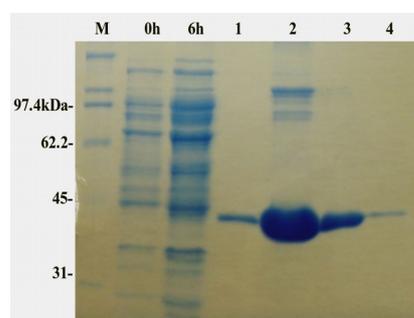


Figura 8. Purificação da proteína recombinante Trr1 de *C. neoformans*. (A) Perfil cromatográfico da proteína solubilizada e purificada do extrato de *E. coli* BL21(DE3) em uma coluna de níquel. A fração foi eluída da coluna IMAC com ~40% de tampão de eluição usando o sistema de expressão ÄKTA Purifier (linha preta pontilhada, % do imidazol). (B) SDS-PAGE das frações obtidas na purificação. Os números (1-4) indicam o pico do cromatograma, com frações de 1 mL. (0 h) sem IPTG. (6 h) indução com IPTG 1 mM. Presença de *CnTrr1* nas etapas de eluição com uma banda de aproximadamente 39 kDa conforme esperado. (M) Marcador de massa proteica *Unstained Protein*.

Estudos no nosso grupo de pesquisa de Trr-His (cauda de histidina) em outros fungos patogênicos humanos, *C. albicans* e *P. lutzii*, concordam com nossos resultados, a proteína

recombinante expressa no sistema BL21(DE3) a 37 °C é encontrada na fração solúvel, e é purificada com alto nível de pureza (Godoy *et al.*, 2016; Abadio *et al.*, 2015). O rendimento foi em média de 5 mg de Trr1 por litro de cultura bacteriana.

3.2.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) da proteína recombinante *CnTrr1*

Logo após da cromatografia de afinidade e a avaliação de sua eficiência mediante SDS-PAGE, as frações eluídas foram submetidas a medidas de DLS. As informações adicionais sobre a polidispersidade da proteína em diferentes pHs pode ser observada no ANEXO B (Tabela 4). O resultado obtido neste estudo indica que as populações se apresentam monodispersas na solução tampão em pH ácido e básico com índice de polidispersividade (PDI) de aproximadamente 0,15.

3.2.3 Cromatografia de exclusão molecular da proteína recombinante *CnTrr1*

Para obter maior nível de pureza da proteína e estimar a massa molecular, foi executada a técnica de cromatografia de exclusão molecular. A amostra de 500 µL, foi aplicada na coluna de exclusão molecular a uma concentração de ~2 mg/mL. O volume de eluição apresentou um pico máximo de absorbância no volume de 8,36 mL, confirmando que *CnTrr1* comporta-se como um dímero em solução com uma massa estimada de 75 kDa, (monômero ~39 kDa) (Figura 9).

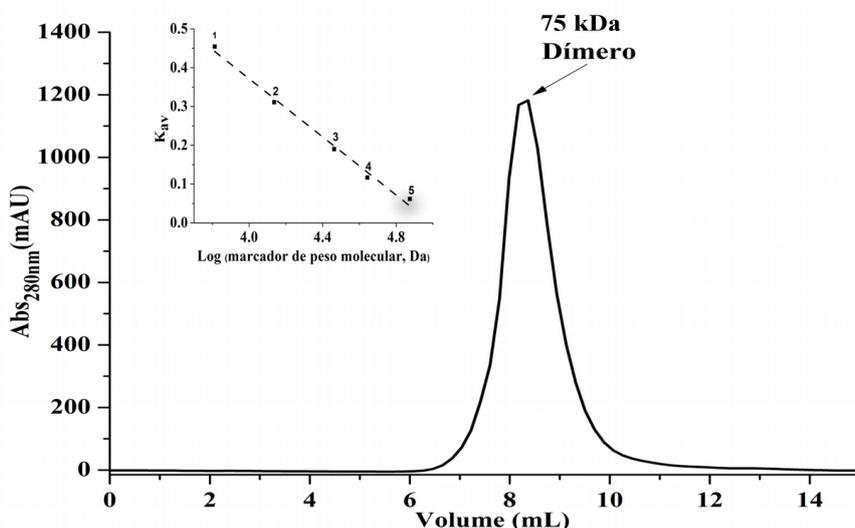


Figura 9. Gráfico da cromatografia de exclusão molecular para *CnTrr1*. A proteína foi carregada numa coluna Superdex 75 10/300 (GE), executada em Tris-HCl 30 mM pH 8,5 e NaCl 300 mM, com uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. A inserção mostra a curva de calibração da coluna. A massa molecular estimada para Trr1 é de 75 kDa. As proteínas utilizadas como padrões na curva de calibração foram: 1. aprotinina, 2. ribonuclease A, 3. anidrase carbônica, 4. ovalbumina e 5. Conalbumina (75 kDa). O círculo cinza na inserção indica a posição correspondente ao volume de eluição.

De acordo com o proposto na literatura, as L-Trr de bactérias, fungos, entre outros organismos, são enzimas diméricas que contém uma flavina e um dissulfeto ativo redox em cada subunidade

(Horecká *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2009). Corroborando nossos resultados, Yang e cols., mostraram que a massa molecular nativa da enzima de uma bactéria termófila purificada pela cromatografia de filtração em gel, foi estimada em cerca de 67 kDa (37 kDa, monômero) indicando que a Trr purificada apresenta-se como um homodímero (Yang e Ma, 2010). Perez-Ruiz e cols., demonstraram que na ausência do NADPH, a enzima Trr de cloroplastos é eluída como um oligômero de elevada massa molecular (acima de 669 kDa). Em quanto que, a adição de NADPH provoca uma mudança drástica no estado de agregação. A forma oligomérica quase completamente desaparece, e a maioria da enzima é eluída como uma molécula de baixa massa molecular, provavelmente correspondente ao dímero, embora alguns estados intermediários de agregação fossem detectados (Pérez-Ruiz *et al.*, 2009).

3.2.4 Espectros de *CnTrr1* em diferentes pHs e na presença de NADPH

Os estudos de fluorescência intrínseca da *CnTrr1* foram realizados nos pHs 4,0, 4,4, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0. Os espectros de emissão do triptofano após excitação em 295 nm, mostraram uma emissão de fluorescência máxima em aproximadamente 332 nm para o pH 4,0; 331,4 nm para o pH 4,4; 331,7 nm para o pH 5,0; 330,1 nm para o pH 6,0; 331,5 nm para o pH 7,0; 332 nm para o pH 8,0 e 332 nm para o pH 9,0 (Figura 10).

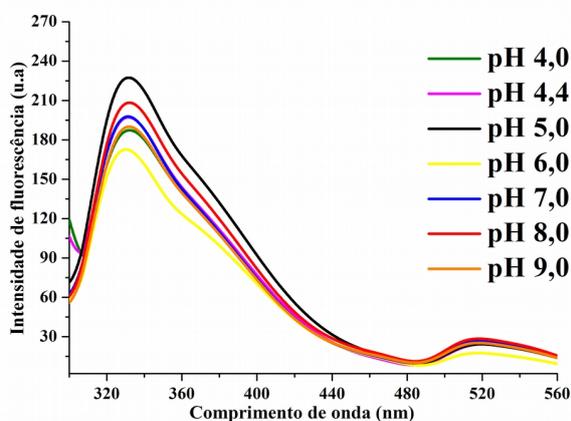


Figura 10. Espectros de emissão fluorescência da proteína *CnTrr1* em diferentes pHs.

Os valores da intensidade de emissão de fluorescência emitida da *CnTrr1* foram maiores nos pH 5,0 e 8,0. Adicionalmente, os espectros de emissão de fluorescência mostraram-se dependentes do pH, gerando deslocamentos entre as faixas testadas. No pH 6,0 houve maior deslocamento da banda de emissão para comprimentos de onda menores (330,1 nm), sugerindo mudanças no ambiente iônico ao redor dos triptofanos. A variação da força iônica do ambiente provavelmente gerou reposicionamento

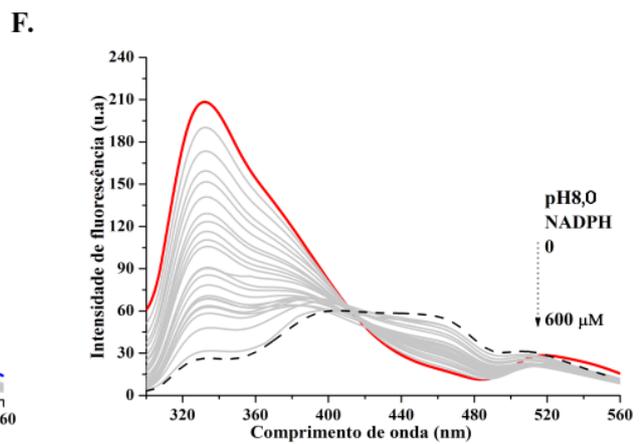
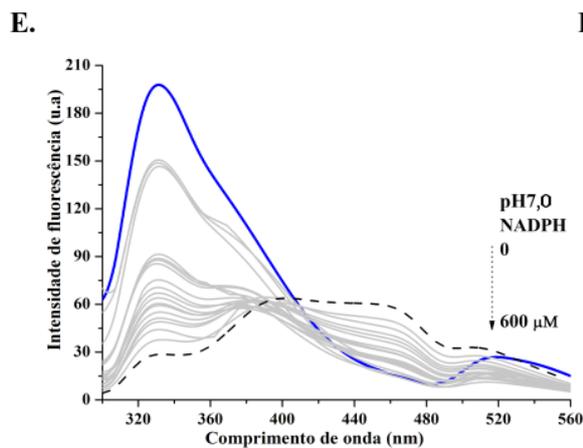
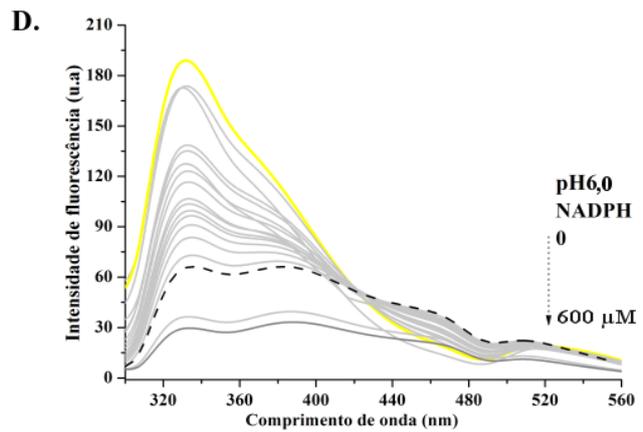
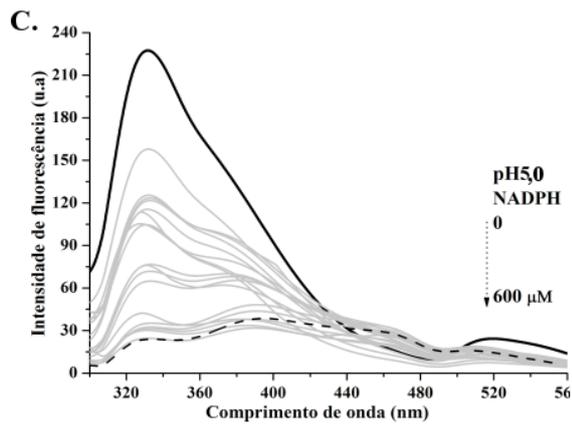
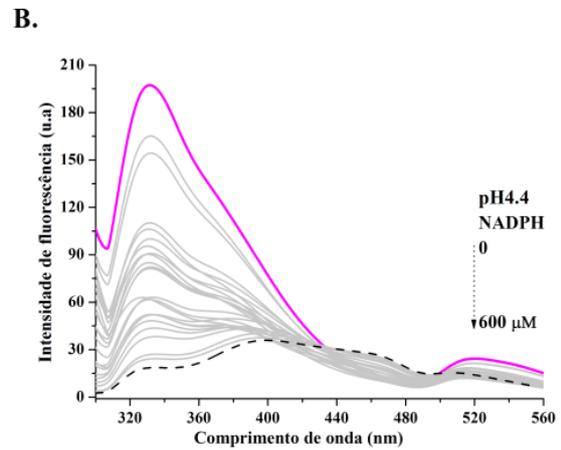
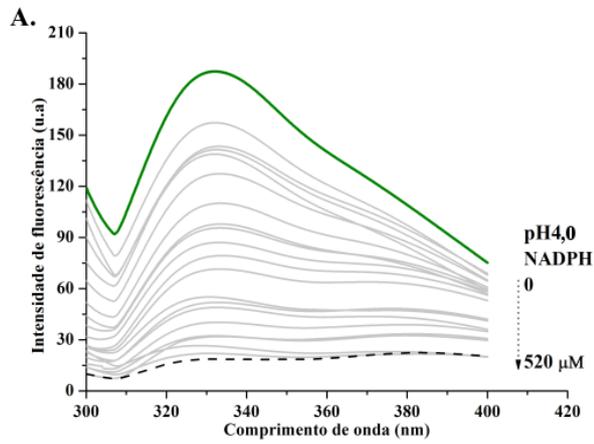
dos triptofanos para região semienterrada, no interior da proteína, levando à diminuição da intensidade de emissão de fluorescência.

A variação da fluorescência de modo dependente do pH é influenciada pelos grupos supressores adjacentes ao triptofano. Segundo Lakowicz (2008), o mecanismo de supressão requer a transferência de um próton intramolecular de um grupo protonado (exemplo: grupo carboxílico) para o anel indol do triptofano, que ocasiona um rendimento quântico reduzido por causa da protonação do anel indol. A análise de sequência e estrutura da *CnTrr1*, evidenciam a presença de três resíduos de triptofano (Trp¹²⁷, Trp¹⁶³ e Trp²³⁷), que provavelmente estão contribuindo para os espectros de emissão de fluorescência obtidos. Especificamente, como o Trp¹⁶³ na estrutura oxidada, está próximo da cisteína Cys¹⁷⁰ do sítio ativo, é possível que este aminoácido esteja envolvido na formação do sítio catalítico. Adicionalmente, a vizinhança hidrofóbica deste resíduo favorece a internalização e, provavelmente, a configuração do sítio catalítico. Aminoácidos carregados (Glu¹⁵⁹-Glu¹⁶⁰ e Arg¹⁵¹) também são observados perto do anel indólico. O Trp¹²⁷ localizado no domínio de ligação ao FAD está rodeado de resíduos carregados negativamente (Glu¹³²⁻¹³⁴), enquanto que o Trp²³⁷ é encontrado no domínio de ligação ao NADPH na periferia da estrutura, embora com dois aminoácidos carregados negativamente (Asp²¹⁵-Glu²¹⁶) perto do anel.

Estudos com outras proteínas (3 α -hidroxiesteroide desidrogenase que utiliza o NADPH como cofator) mostraram que os triptofanos que se encontram perto do sítio ativo são importantes na ligação do substrato. A fluorescência pode ser suprimida após a ligação do NADPH, por um mecanismo de transferência de energia (10 Å do anel de nicotinamida), que está relacionado com mudança conformacional da proteína após a ligação do cofator (Jez *et al.*, 1996). Atualmente, não existe nenhum estudo de mutagênese sítio dirigida para investigar as contribuições dos três triptofanos na fluorescência de *CnTrr1* e os papéis de cada um relacionado ao cofator. Porém, nos estudos realizados nesse trabalho, com o modelo reduzido da *CnTrr1*-AADP, conformação FR (pág. 72), o Trp²³⁷ e o Trp¹⁶³ se localizam a uma distância de ~17 e 20 Å do anel de nicotinamida, respectivamente, sendo os resíduos Trp mais próximos para que a transferência de energia ocorra. Sendo assim, sugere-se que estes triptofanos contribuiriam mais para os espectros de fluorescência. No entanto, a supressão de fluorescência pode também resultar de uma supressão de outros resíduos no bolsão de ligação do cofator.

Estudos de mudança conformacional da proteína *CnTrr1* foram realizados na presença do NADPH nos pHs 4,0; 4,4; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0. A **Figura 11**, mostra a diferença nos espectros de emissão de fluorescência da *CnTrr1* na ausência e na presença de NADPH. O cofator NADPH atua

como agente atenuador, diminuindo a intensidade de fluorescência da proteína *CnTrr1* mediante o aumento da concentração. Este resultado foi observado para todos os pHs avaliados, entretanto, não houve deslocamentos do centro de massa da banda de fluorescência mediante a adição de NADPH.



G.

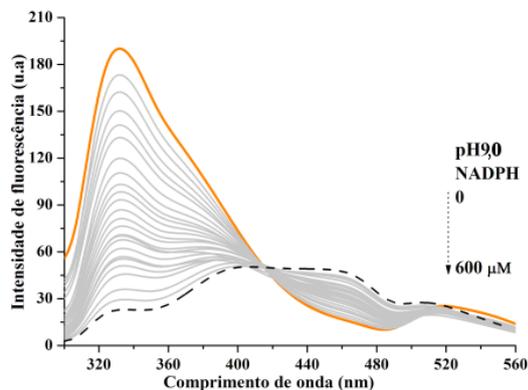


Figura 11. Atenuação de emissão de fluorescência da proteína *CnTrr1* na presença de NADPH em concentrações crescentes, nos pHs 4,0 (A), 4,4 (B), 5,0 (C), 6,0 (D), 7,0 (E), 8,0 (F) e 9,0 (G) a 25°C. A maior intensidade de fluorescência observada foi nos pHs 8,0 e 9,0. As cores representam a proteína na ausência do NADPH. As concentrações de NADPH utilizadas variaram entre 26 µM e 600 µM.

Para os diferentes pHs avaliados em concentrações crescentes de NADPH, a banda de fluorescência da *CnTrr1* apresentou sutis deslocamentos da banda de emissão em direção a 340 nm. A holoenzima (*Trr1*-NADPH) no pH 4,0 apresentou um pico de emissão em 333,5 nm, no pH 4,4 em 332,5 nm, no pH 5,0 em 332,6 nm e no pH 6,0 em 331,5 nm. Entretanto, nos pH 7,0, 8,0 e 9,0 esse deslocamento não foi observado (331,3, 332,4 e 332,4 nm, respectivamente). Essas mudanças nos espectros de emissão da *CnTrr1*-NADPH podem estar relacionadas a uma transição conformacional, em consequência da ligação do NADPH, afetando o microambiente das cadeias laterais dos triptofanos. Adicionalmente, houve emissão de fluorescência simultânea do NADPH a 440-460 nm, indicando que possivelmente parte da supressão da emissão de fluorescência da proteína, pode ter ocorrido pela transferência de energia dos resíduos fluorescentes da proteína para o anel 1,4-dihidronicotinamida de NADPH que absorve na mesma região espectral de emissão do triptofano (340 nm) (Kubiseski *et al.*, 1992). O aumento da fluorescência em 440-460 nm resulta da formação do complexo enzima-NADPH, onde o doador e o receptor foram, respectivamente, o triptofano intrínseco de *CnTrr1* e o NADPH ligado à enzima (Lacey *et al.*, 2008; Li e Lin, 1996).

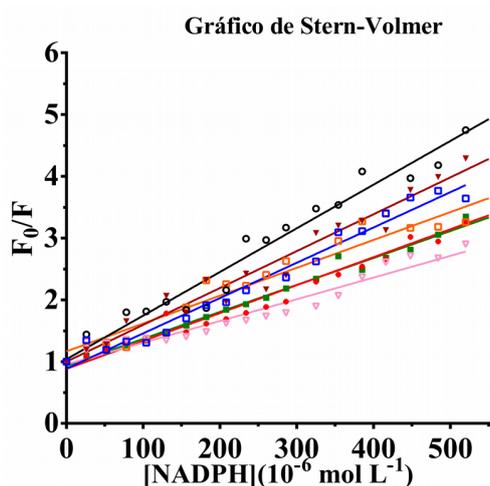
No pH 4,4 e 5,0 a conformação da proteína foi alterada com a adição de altas concentrações de NADPH. A banda de emissão se deslocou para o vermelho (*red-shift*). Estes ajustes ocorreram provavelmente em consequência da redistribuição parcial de cargas elétricas nas imediações dos resíduos protonados (Konev e Udenfriend, 1967). No pH 7,0 a perda brusca de intensidade da fluorescência na presença do NADPH, sugere que o ambiente molecular do triptofano foi afetado pelos grupos carboxílicos das cadeias laterais dos aminoácidos ácidos, que estavam negativamente carregados em pH fisiológico.

As características de fluorescência para os nucleotídeos de piridina reduzidos foram relatadas para outras enzimas ligadas ao cofator (17 β -desidrogenase, lactato desidrogenase, etc) mostrando que no complexo enzima-cofator, a fluorescência do NADPH aumenta e a emissão máxima é deslocada para o azul. Esse efeito pode ser da mudança conformacional da coenzima após ligação ou da ligação da coenzima reduzida na superfície da enzima (Li e Lin, 1996). Na TrxR de *E. coli*, o AADP+ (análogo de NADPH oxidado) suprime a fluorescência do FAD, enquanto que a do NADP+ não é afetada. Na TrxR de *A. thaliana*, AADP+ praticamente não altera a fluorescência do FAD, e o NADP+ aumenta. Segundo Nivinskas e cols., isso pode ser atribuído à supressão da fluorescência do FAD que pode ser causada pelo anel doador de elétrons 3-aminopiridina da AADP+ ou devido a diferenças nas posições relativas dos domínios de ligação ao FAD e ao NADP(H) em *E. coli* e *A. thaliana*. Neste caso, o domínio NADP(H) da *AtTrxR* deve ser girado em 8° para se sobrepor sobre o domínio correspondente da enzima em *E. Coli*. (Nivinskas *et al.*, 2001). Os resultados descritos aqui sugerem que a ligação do NADPH no domínio de ligação da *CnTrr1* suprime a emissão de fluorescência da enzima e aumenta a fluorescência do NADP(H). Estudos realizados com AADP+ relataram a supressão de emissão de fluorescência da flavina, que é uma sonda para localização da posição da ligação do nucleotídeo de piridina ao FAD (Mulrooney e Williams, 1997). Estudos sugerem que o NADPH reduzido se liga à oxidoreductase na conformação FO, longe do FAD (distância reportada na literatura ~17 Å), onde não há efeito sobre a fluorescência da flavina (Tu, 1981). Na **Figura 11** não é observada emissão de fluorescência a 540 nm, em nenhuma das concentrações de NADPH.

Segundo Van Den Berg e col., (2001) a supressão de fluorescência da flavina na conformação FO da Trr mutante em *E. coli* (C138S) ocorre devida à interação de transferência de cargas com um resíduo localizado em distância *van der Waals* da flavina, resultando em um retorno quase instantâneo ao estado fundamental. Os únicos candidatos para tal interação seriam: Ser¹³⁸ e o grupo tiol na posição 135, já que estes resíduos ficam na proximidade do local eletrofílico da flavina (N5 e átomos C4) na conformação FO. Na conformação FR pelo contrário, esses resíduos são afastados para o lado dos grupos metil da flavina, que parece menos favorável para a supressão de fluorescência (Van Den Berg *et al.*, 2001). Assim, se sugere que a adição do NADPH induz transições conformacionais na proteína, mas, não gerou um sítio de supressão adicional perto da flavina.

A emissão de fluorescência de Trr1 diminuiu com o aumento da concentração do supressor NADPH. Portanto, os dados de atenuação foram utilizados para cálculo da constante de Stern-Volmer, permitindo assim avaliar a linearidade da relação entre a supressão da emissão versus o aumento na concentração do NADPH em diferentes pHs. A constante de Stern-Volmer (*K_{sv}*) foi calculada

transformando os dados em uma razão F_0/F (intensidades de fluorescência na ausência e na presença do NADPH, respectivamente), que variou conforme aumento da concentração do atenuador (Q). No gráfico de K_{sv} os valores calculados para enzima ligada ao NADPH nos pHs 4,0; 4,4 e 5,0 foram semelhantes e altos, no entanto, para os pHs 6,0; 7,0; 8,0; e 9,0; os valores apresentados foram menores (Figura 12).



- pH 4,0
- pH 4,4
- pH 5,0
- ◇ pH 6,0
- △ pH 7,0
- ▽ pH 8,0
- ◇ pH 9,0

Figura 12. Gráfico de Stern-Volmer para *CnTrr1*, usando o NADPH como atenuador a 25 °C. As concentrações de NADPH utilizadas foram de 0 a 520 μM , em tampão citrato de sódio 5 mM pH 4,0; 4,4; 5,0 e 6,0; e tampão hepes 5 mM pH 7,0; 8,0 e 9,0.

A linearidade do gráfico de Stern-Volmer (Figura 12) indica que a proteína apresenta uma única classe de resíduos de triptofano acessíveis ao atenuador (Lakowicz, 2008). Os valores das constantes Stern-Volmer (Tabela 5), obtidos em função do pH, foram de duas ordens de magnitude maior do que o valor reportado para o triptofano em água. Estes dados indicam que a atenuação ocorrida é do tipo estática (Lakowicz, 2006), em decorrência da formação do complexo *CnTrr1*-NADPH favorecido por interações não covalentes nas vizinhanças dos resíduos de triptofano. Adicionalmente, para o pH 4,4 e 5,0 os valores de K_{sv} foram maiores quando comparados aos outros pHs, o que sugere que a formação do complexo foi acompanhada de maiores mudanças conformacionais da proteína.

Tabela 5. Constante de Stern-Volmer (K_{sv}) e constante de dissociação (K_d) do complexo *Trr1*-NADPH em pHs diferentes

pH	Enzima-NADPH				
	K_{sv} ($\times 10^2$) M^{-1}	R^2	K_d ($\times 10^{-4}$) M^1	B_{max} ($\times 10^{-4}$)	R^2
4,0	$56,69 \pm 2,3$	0,97	$4,27 \pm 0,56$	$2,82 \pm 0,19$	0,98
4,4	$60,06 \pm 3,4$	0,94	$1,47 \pm 0,15$	$1,91 \pm 0,06$	0,98
5,0	$69,94 \pm 3,6$	0,95	$1,59 \pm 0,21$	$2,45 \pm 0,11$	0,96
6,0	$35,17 \pm 1,9$	0,94	$63,91 \pm -$	$16,78 \pm -$	0,96
7,0	$43,64 \pm 3,6$	0,90	$1,45 \pm 0,26$	$1,80 \pm 0,10$	0,94
8,0	$44,83 \pm 2,4$	0,95	$3,24 \pm 0,29$	$2,25 \pm 0,09$	0,99
9,0	$43,64 \pm 1,07$	0,98	$3,10 \pm 0,16$	$2,08 \pm 0,05$	0,99

Saturação ou B_{max} = ocupação máxima. K_d = concentração de ligante necessária para determinar 50% da ocupação máxima; é inversamente proporcional à afinidade.

As constantes de dissociação foram calculadas para o complexo *CnTrr1* e NADPH em diferentes pHs (**Tabela 5**), considerando os dados das intensidades de fluorescência inicial de Trr1 (F_0) e a intensidade de fluorescência da enzima ligada ao NADPH (F) (**Figura 12**). Quanto menor o valor de k_d menor é a concentração do ligante necessária para saturar a proteína e maior será a afinidade da proteína pelo ligante. O valor de $B_{máx}$ indica a saturação da enzima, ou seja, a concentração onde o NADPH encontra-se em uma concentração que não ocorre mais dissociação.

Segundo os valores de K_d calculados, a proteína apresenta maior afinidade ao NADPH nos pHs 4,4, 5,0 e 7,0; entretanto, para o pH 6,0 o valor obtido mostrou uma ligação não específica. Na estrutura do complexo *SsTrxR*-(NADP) em *Sulfolobus solfataricus*, o grupo fosfato P2B do NADP está localizado no sítio ativo, na proximidade da cadeia lateral do resíduo Glu⁴⁶. Segundo os autores, a presença desta cadeia lateral negativamente carregada provavelmente reduz a afinidade da proteína pelo NADP⁺ (Ruggiero *et al.*, 2009). Estudos na proteína *BmG6PD* mostraram que o NADPH reduzido tem uma afinidade maior pela proteína quando comparado ao NADP⁺ ($1,5 \times 10^{-5}$ M). A alta afinidade de *BmG6PD* (Glucose-6-fosfato desidrogenase de *Brugia malayi*) pelo NADPH pode ocorrer devido à ligação mais eficiente do NADPH no sítio ativo da proteína, onde o cofator ligado é completamente enterrado na fenda profunda da proteína, o que pode ser responsável pela alta afinidade da ligação do cofator (Verma *et al.*, 2016).

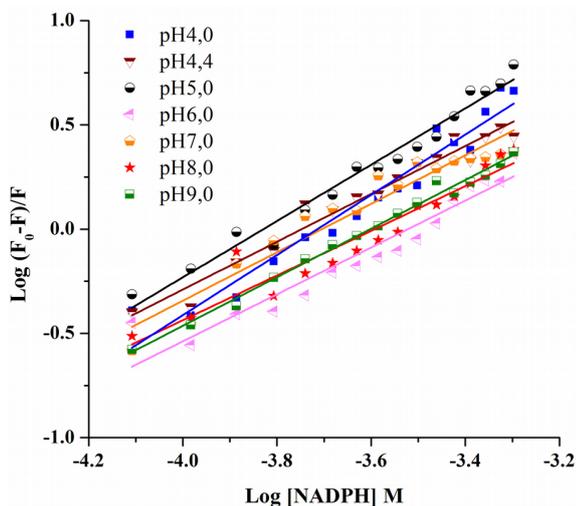


Figura 13. Interação entre a proteína *CnTrr1* e o cofator NADPH monitorada pela atenuação de fluorescência. Gráfico duplo logarítmico para o cálculo da constante de associação (K_a) e número de sítios de ligação (n). O NADPH foi utilizado em concentrações variando de 0 a 520 μ M em tampão citrato de sódio 5 mM (pH 4,0; 4,4; 5,0 e 6,0) e tampão hepes 5 mM (pH 7,0; 8,0 e 9,0) a 25 °C.

A regressão linear obtida a partir do gráfico $\log((F_0 - F)/F)$ vs $\log[Q]$ (**Figura 13**), mostrou os seguintes valores: pH 4,0: $5,3 (\pm 0,32) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$; pH 4,4: $4,3 (\pm 0,21) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; pH 5,0: $5,17 (\pm 0,20) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; pH 6,0: $3,8 (\pm 0,31) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$; pH 7,0: $4,3 (\pm 0,31) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; pH 8,0: $3,85 (\pm 0,29) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; e pH 9,0: $4,2 (\pm 0,10) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. A partir dos valores de K_a obtidos a afinidade da enzima pelo cofator ocorre na ordem de: pH 5,0 > pH > 4,4 = pH 7,0 > pH 9,0 > pH 8,0 > pH 4,0 > pH 6,0. Sendo assim,

os resultados mostraram que a *CnTrr1* apresentou maior afinidade ao NADPH nos pHs 5,0; 4,4 e 7,0 e menor afinidade nos pHs 4,0 e 6,0. Os valores n calculados do menor ao maior pH estudado foram de: 1,44 – 1,06 – 1,35 – 1,02 – 1,15 – 1,07 e 1,25. Este resultado sugere que existe apenas um único local de ligação preferencial das moléculas do NADPH à proteína (Lissi *et al.*, 2013).

3.2.5 Dicroísmo circular

A estrutura secundária da enzima *CnTrr1* foi caracterizada por dicroísmo circular na região distante UV (190-260 nm) a 25 °C em função do pH. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 14** e mostraram que a estrutura secundária da *CnTrr1* é dependente de pH. As bandas dicróicas negativas em 208 e 222 nm que correspondem ao sinal de α -hélice, diminuíram em função da redução do pH. Nos pH 7,0 e 9,0, a proteína se apresenta mais estruturada, com elipticidade molar na região de folha β e α -hélice (218, 208 e 222 nm respectivamente) em torno de -6. O contrário foi observado, para os pHs 4,0 e 5,0, onde houve redução das bandas dicróicas. Portanto, a proteína em estudo nos pHs neutros e alcalinos não apresentou alterações nas estruturas secundárias a 25 °C, se comparado com os pHs ácidos (4,0 e 5,0). Os espectros dicróicos da proteína *CaTrxR* de *C. albicans* obtidos na região Far-UV estão em concordância com o resultado obtido para a proteína *CnTrr1*. Esta enzima, em condições ácidas, apresentou redução no sinal dicróico na região de bandas negativas de 208 e 222 nm, sugerindo menor conteúdo de estrutura α -hélice e predominância de estruturas em folhas β , quando comparado ao pH neutro e alcalino, indicadas pela banda positiva em 195 nm (Godoy *et al.*, 2015).

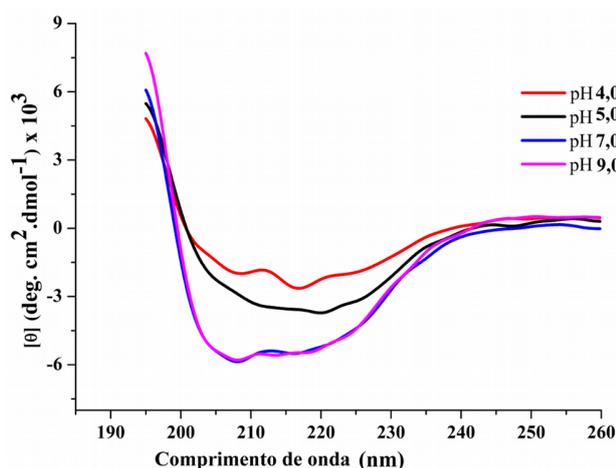


Figura 14. Espectros dicróicos em região Far-UV (195-260 nm) da *CnTrr1* obtidos a 25 °C. A proteína foi solubilizada em tampão acetato de sódio 2 mM (pH 4,0 e 5,0) e tampão tris-HCl 2 mM (pH 7,0 e 9,0).

3.2.6 Estrutura secundária da *CnTrr1* em função da temperatura

A estabilidade térmica da *CnTrr1* foi caracterizada em diferentes pHs. As curvas de desnaturação térmica indicaram alterações na estrutura secundária da proteína em função do pH e aumento da temperatura, conforme mostrado na **Figura 15 e 16**. Os espectros dicróicos obtidos durante

a desnaturação (195-260 nm) para os pHs 4,0 e 5,0 mostraram uma diminuição gradual no sinal dicróico (crescente até -0,5 e zero, respectivamente) em função da temperatura, sugerindo a desnaturação da proteína. Em contrapartida, no pH 7,0 houve uma diminuição lenta do sinal dicróico em 208 nm, indicando mudanças na estrutura secundária em regiões ricas em α -hélice, principalmente a partir de 75 °C, e mudanças sutis nas bandas dicróicas negativas em 218 nm e 222 nm. No pH 9,0 houve deslocamento das bandas dicróicas negativas de α -hélices (208 e 222 nm) para comprimentos de onda de estrutura desordenadas (200 nm) em temperaturas acima de 65 °C, caracterizando perda de estrutura secundária da proteína.

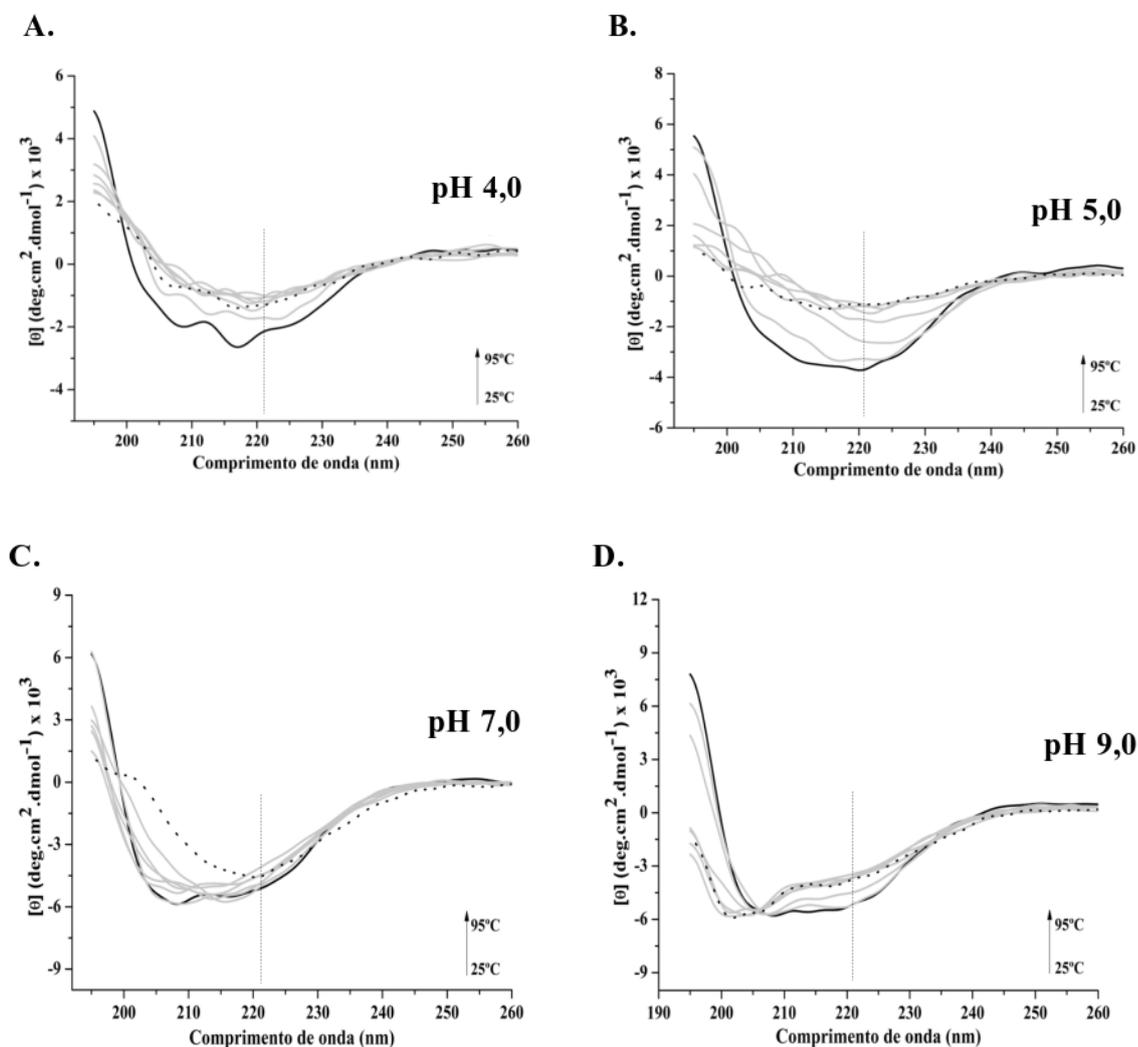


Figura 15. Espectros dicróicos em Far-UV na faixa de 195-260 nm da *CnTrr1* em função do pH e temperatura. (A-B) Espectros de dicróismo circular em tampão acetato de sódio 2 mM pH 4,0 e 5,0. A seta indica aumento da temperatura de 25 a 95 °C, com alteração no sinal dicróico. **(C-D)** Espectros de dicróismo circular obtidos tampão tris-HCl em 2 mM nos pH 7,0 e 9,0. A seta indica o aumento da temperatura de 25 a 95 °C, sendo a linha pontilhada preta correspondente a 95 °C.

Todas as curvas de desnaturação mostraram alterações na estrutura secundária, sendo mais pronunciadas nos pHs ácidos. Entretanto, nos pHs 7,0 e 9,0, essas alterações foram menos evidentes, principalmente em regiões ricas em α -hélice. O sinal dicróico foi mantido em torno de -4400 e -6000 graus cm^2/dmol a 95 °C, respectivamente, sugerindo desdobramento parcial e estabilidade estrutural da proteína nestes pHs. Resultados similares foram observados na TrxR em *C. albicans* nos pHs 7,0 e 8,0 com a manutenção de um sinal dicróico em torno de -4500 e -5000 graus. $\text{cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ a 95 °C, respectivamente (Godoy *et al.*, 2016). Os resultados obtidos mostraram que a CnTrr1 parece ser mais estável no pH 7,0, que no pH 9,0, e as maiores mudanças conformacionais ocorrem no pH 5,0. A CnTrr1 contém 15/11/21 do número total de resíduos de Arg, His e Lys, enquanto que contém 34/17 resíduos de Glu e Asp.

Os dados obtidos para as curvas de desnaturação térmica foram normalizados considerando as frações da proteína no estado nativo para o desnaturado (f_u). Os resultados do ensaio de desnaturação estão mostrados na **Figura 16A**. Para todos os pHs avaliados após 48 °C, desdobramento e/ou alterações conformacionais da proteína são observados. Nos pHs 7,0 e 9,0, o processo de agregação foi observado após 70 °C, sugerindo um processo intermediário de dobramento/desdobramento da CnTrr1 de 25 a 95 °C, estado "glóbulo fundido" (*molten globule*) em ambos os pHs. Para o pH 5,0, a curva de desnaturação normalizada de CnTrr1 indicou que a proteína desdobra-se apresentando dois estados, nativo/desnaturado. O ponto de inflexão entre os dois estados, denominado de *Temperature of Melting* (T_m), foi de 49,15 °C (**Figura 16B**). Já nos pH 4,0 7,0 e 9,0 a proteína apresentou agregação e, portanto, os parâmetros termodinâmicos não foram calculados.

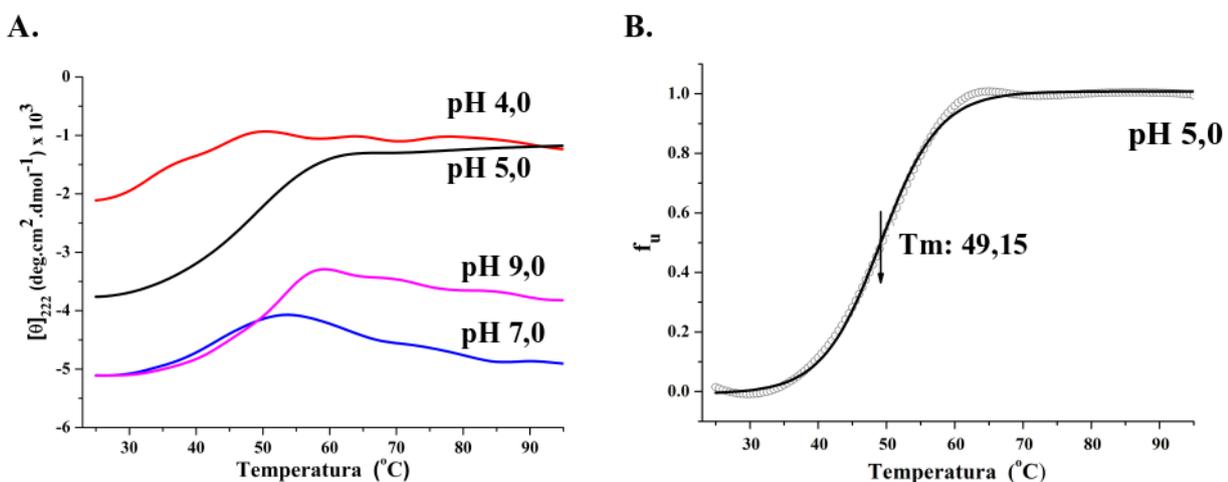


Figura 16. Curvas de desnaturação térmica da CnTrr1. (A) Curvas de desnaturação nos pH 4,0; 5,0; 7,0 e 9,0. (B) Normalização da curva de desnaturação de CnTrr1 no pH 5,0. A seta indica ponto de transição ($T_{melting}$) entre estado nativo/desnaturado.

Os resultados observados para *CnTrr1* estão em concordância com uma T_m de *S. Solfataricus*. Para esta proteína, os experimentos de desnaturação térmica indicaram que em altas temperaturas o desdobramento está associado à agregação. Embora essa alteração estrutural não permita a caracterização completa do processo de desnaturação da enzima, a aparência dos espectros de DC em altas temperaturas (80 - 85 °C), e os espectros até 75 °C se assemelham aos coletados à temperatura ambiente, indicando que a proteína é termostável (Ruggiero *et al.*, 2009). O valor de T_m calculado para a *CnTrr1* em pH 5,0, é semelhante ao valor de T_m de 48 °C obtido para a proteína *CaTrxR* e proteínas mesofílicas, respectivamente (Godoy *et al.*, 2016; Kumar e Nussinov, 2001).

3.2.7 Parâmetros termodinâmicos

Os parâmetros termodinâmicos, calculados de acordo com a aproximação de van't Hoff (**Figura 17**) para o pH 5,0, foram $\Delta H = 49,770$ kcal/mol, $\Delta S = 154,57$ cal/mol.K, e energia livre Gibbs (ΔG^{25}) = 3,588 kcal/mol, que são compatíveis com processo endotérmico e com a estabilidade moderada da proteína. Adicionalmente, estes valores foram próximos, se comparado à *TrxR* de *C. albicans*, que apresentou estabilidade moderada (Godoy *et al.*, 2015).

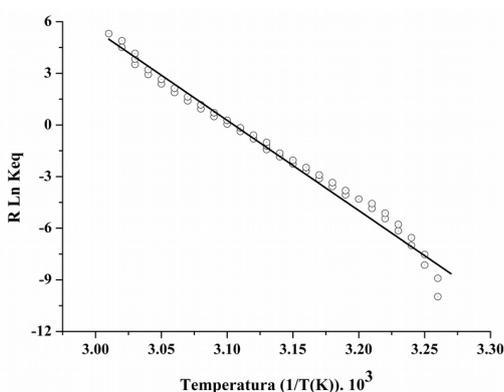


Figura 17. Aproximação de van't Hoff de *CnTrr1* no pH 5,0. Por meio dessa relação foram calculados a variação de entalpia (ΔH) e de entropia (ΔS). O índice de correlação (R^2): 0,99.

Em geral, os resíduos de aminoácidos mais abundantes que compõem a *CnTrr1* são Gly (10,2%), Ala (9,4%) e Thr (9,2%), bem como resíduos de aminoácidos carregados (12,7% carregados positivamente e 13,8% carregados negativamente), com conteúdo relativamente baixo de cisteínas (0,8%). A estabilidade conformacional das proteínas pode ser explicada não somente pelas interações eletrostáticas, mas também pelas contribuições que geram as interações hidrofóbicas, as ligações de hidrogênio e as ligações dissulfeto que são responsáveis pelo dobramento e estruturação apropriada. Considerando a oxidoreductase *CnTrr1* uma estrutura homodimérica, espera-se que apresente dois ligações de dissulfeto, estas ligações aumentam a estabilidade conformacional principalmente ao

restringir as conformações desdobradas da proteína e assim diminui sua entropia conformacional (Pace, 1990).

3.2.8 Espectros Far-UV de *CnTrr1* a 25 °C, complexada ao NADPH em função do pH

A estabilidade estrutural da *CnTrr1* na presença do NADPH foi investigada por DC em função da concentração do cofator nos pHs 5,0 e 7,0. Os espectros dicróicos obtidos na presença de NADPH (26 e 52 μM) e nos diferentes pHs indicaram que a proteína sofreu modificações na estrutura secundária, indicado pelas alterações do sinal e das bandas dicróicas negativas em 208 e 222 nm e positivas em 195 nm (**Figura 18**).

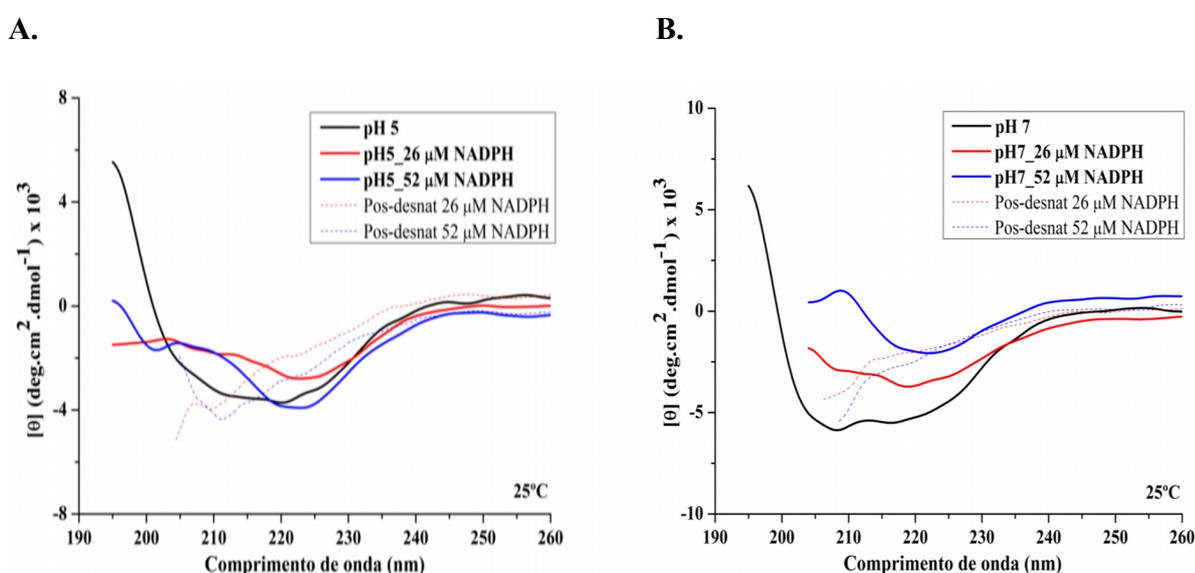


Figura 18. Espectros Far-UV na faixa 195-260 nm da *CnTrr1*-NADPH em função do pH. (A) Espectros de dicroísmo circular de tampão acetato de sódio 2mM pH 5,0. (B) Espectros de dicroísmo circular de tampão tris-HCl 2 mM pH 7,0. A linha pontilhada representa espectros coletados após ensaio de desnaturação térmica.

Estas mudanças observadas na estrutura secundária da *CnTrr1* também foram reportadas em uma TrxR humana durante a formação de complexo com o NADPH (20 μM) em pH 7,0 (Oblong *et al.*, 1993). A análise da estrutura secundária na região distante da UV mostrou redução no conteúdo α -hélice e folhas betas para a enzima na presença do NADPH, indicado pela redução do sinal dicróico em 208 e 222 nm e em 195 nm, respectivamente.

Estas alterações estruturais citadas na presença do NADPH, indicam que interações eletrostáticas, as quais são enfraquecidas pela adição do NADPH, desempenham um papel importante na estabilização da *CnTrr1*. A disponibilidade do modelo reduzido (FR) a partir da estrutura tridimensional da proteína oxidada possibilitou identificar resíduos carregados localizados no domínio

de ligação ao NADP(H) da enzima e interações específicas entre resíduos carregados na vizinhança deste cofator. Esta rede de interações envolve só quatro resíduos carregados positivamente (Arg³²³, Arg²¹⁸, Arg²¹⁴ e Arg²¹³) e um resíduo carregado negativamente (Asp¹⁹²), fazendo uma ligação de hidrogênio com o anel nicotinamida. Assim, a *CnTrr1* seria estabilizada pela existência de interações entre os domínios de ligação ao NADPH e ao FAD, e a formação dos complexos entre a enzima e os cofatores é responsável pelas mudanças conformacionais observadas nos espectros de DC.

As curvas de desnaturação térmica da *CnTrr1* ligada ao NADPH foram obtidas nos pHs 5,0 e 7,0 variando a temperatura entre 25 e 95 °C (**Figura 19**). Os dados apresentados na Figura 19 e 20 mostraram que na presença do cofator houve alterações estruturais, indicadas pela diminuição expressiva do sinal dicróico e deslocamentos das bandas em 208 e 222 nm (Figura 18), além da tendência à agregação a partir de 65 °C (pH 5,0) e 55 °C (pH 7,0) (Figura 19). Os dados obtidos dos espectros de 260 a 195 nm e das curvas de desnaturação sugerem que a proteína altera significativamente a estrutura e é menos estável na presença do cofator, características estas que foram mais evidentes em pH 7,0 do que em pH 5,0.

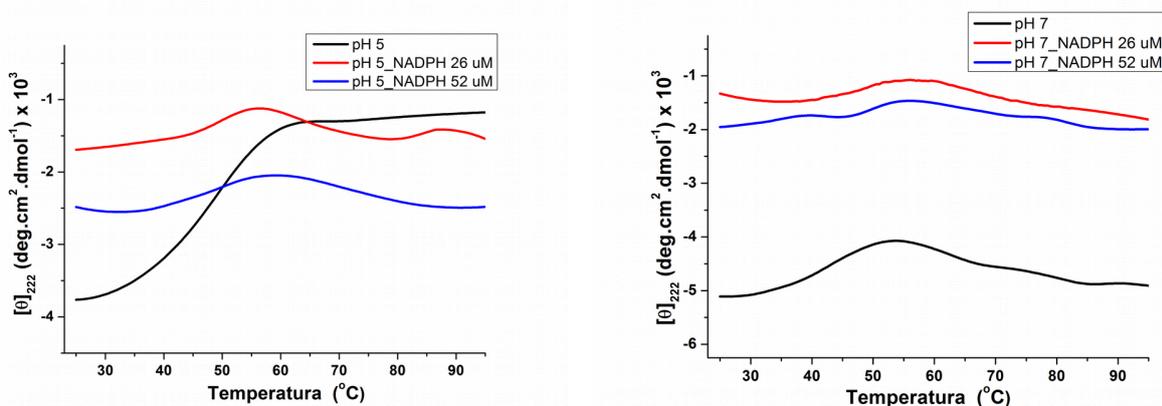


Figura 19. Curvas de desnaturação térmica da *CnTrr1*-NADPH em pHs 5,0 e 7,0.

Estudos de desnaturação da enzima G6PD em *Brugia malayi* (BmG6PD) mostraram que o cofator NADP⁺ influencia a estrutura terciária devido às mudanças significativas no microambiente dos triptofanos da holoenzima. Além disso, observou-se que o NADP⁺ induz a formação de estruturas oligoméricas (Verma *et al.*, 2016). Estudos da Ferredoxina-NADPH redutase (FNR) mostraram que resíduos da FNR foram perturbados quimicamente após a ligação do NADP⁺ no pH 8,0, quando comparado ao pH 6,0. O maior movimento dinâmico no subdomínio C-terminal do NADP-flexível em pH 8,0 resultou na conformação favorável à ligação ao NADP⁺ (Lee *et al.*, 2007). Pelo contrário,

estudos *in silico* da enzima FNR da bactéria patogênica *Leptospira interrogans* (LiFNR) sugerem que a estabilidade da enzima complexada ao cofator no pH 7,5 aumenta, devido ao incremento das interações eletrostáticas entre os domínios de ligação do FAD e NADPH, levando à manutenção estrutural da enzima (Catalano-Dupuy *et al.*, 2011).

3.2.9 Cristalização e refinamento da proteína recombinante Trr1 de *C. neoformans*.

Depois da purificação a proteína recombinante foi concentrada por ultra-filtração (Amicon Millipore) em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,5 e NaCl 30 mM. Ensaios preliminares foram realizados através do kit de pré-cristalização (Pre-Crystallization Test–Hampton Research, USA) com o intuito de determinar a concentração mais favorável para a cristalização. As primeiras tentativas de cristalização da proteína *CnTrr1* foram observadas no kit comercial de cristalização *Crystal Screen 1*. Os ensaios feitos no robô MOSQUITO LCP em placas de 96 poços, pelo método de difusão de vapor com gota pendurada, apresentaram cristais na condição n°41 (0,1 M hepes sódio pH 7,5 + 10% v/v 2-propanol + 20% w/v PEG 4,000) e na condição n°9 (0,2 M acetato de amônio + 0,1 M citrato de sódio dihidratado tribásico pH 5,6 + 30 % w/v PEG 4,000). Em cada poço foram pipetadas 3 gotas numa concentração final de 7,5 mg/mL (superior); 6,25 mg/mL (inferior direita) e 4,17 mg/mL (inferior esquerda). Esses cristais apresentaram um tamanho aproximado de 50 x 25 µm (**Figura 20**). Estes cristais demoraram 10 dias em crescer, no entanto eram muito pequenos e sensíveis.

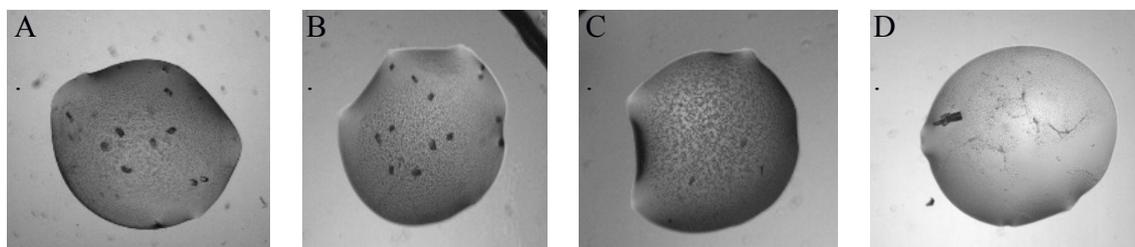


Figura 20. Fotomicrografia do crescimento dos cristais da proteína recombinante *CnTrr1* do fungo patogênico *C. neoformans*. (A, B e C) Condição n°41, gota superior, inferior direita e inferior esquerda, respectivamente. (D) Condição n°9. *Crystal screen 1*. Cristais em forma de *placa*. Cristais obtidos a partir da pipetagem automática do robô Mosquito.

Como os cristais obtidos eram relativamente de baixa qualidade, com o intuito de aprimorar a qualidade e o tamanho dos cristais, vários tipos de refinamento sem êxito, a partir das duas condições citadas na Figura 21, foram realizados em placas de 24 poços. 3 concentrações diferentes da proteína: 7,66 mg/mL, 12,5 mg/mL e 33 mg/mL foram testadas em gotas contendo 1 µL da solução da proteína e 1 µL da solução precipitante equilibrada em 500 µL. Kit 1: condição n°41 com variações de pH na faixa de 7 a 9 e porcentagem do agente precipitante na faixa de 15% a 22%; e a condição n°9 com variações de pH do tampão na faixa de 5,1 a 6 e porcentagem do agente precipitante na faixa de 25% a

33%. Devido a que nenhuma das condições de refinamento foi aceitável quanto à observação de crescimento cristalino, novos *screenings* foram realizados com os kits *Crystal Screen 1* e *2*. Algumas condições promissoras foram obtidas, embora pequenos cristais em agulha foram observados (**Anexo C, Figura 21**).

Dois outros kits de cristalização (*PACT premier HT-96* and *JCSG-plus HT-96*) foram testados junto com técnica do *seed*, como uma estratégia adicional, onde normalmente vários cristais bem pequenos são inseridos numa solução na zona metaestável. Vários cristais em forma de agulha foram observados nas condições:

JCSG+1: 20% PEG 3350 + 299 mM formato de amônio pH 6,6

JCSG+3: 14.4 % PEG 8000 + 20% V/V glicerol + 80 mM MES pH 6,5 + acetato de cálcio 160 mM.

Finalmente o refinamento dessas condições levou à cristalização da proteína sendo observados cristais amarelos maiores, com um tamanho máximo aproximado de $85 \times 60 \times 50 \mu\text{m}^3$, e que difrataram na condição de refinamento que continha: 11,4% de PEG 8000, 20% de glicerol v/v, MES 80 mM pH 6,3 e 160 mM de acetato de cálcio. Os melhores cristais de difração foram obtidos após duas diluições seriadas do *seed*, com gotas de 1,5 μL de solução de reservatório, 1,2 μL de amostra de proteína e 0,3 μL de semente (**Figura 22**).

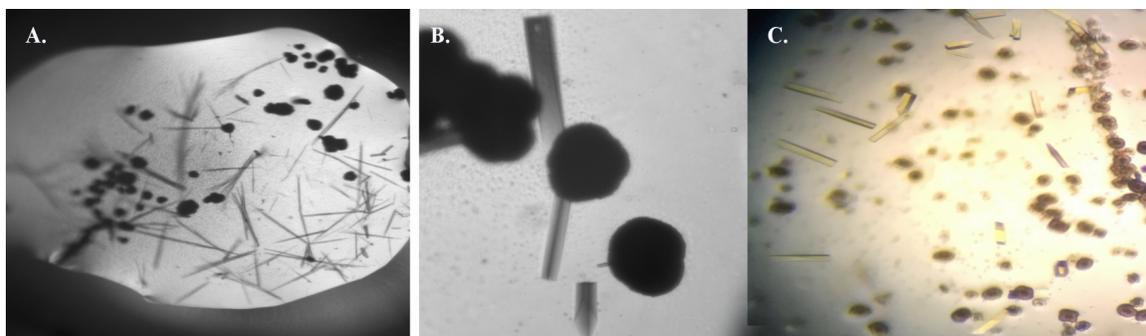


Figura 22. Fotomicrografia do crescimento dos cristais da proteína recombinante Trr1 do fungo patogênico *C. neoformans*, após refinamento. (A) *CnTrr1* condição JCSG+1: (20% PEG 3350 + 299 mM formato de amônio pH 6,6), com obtenção de cristais em agulha que foram triturados (*seed*). (B) *CnTrr1* condição JCSG+3: (14.4 % PEG 8000 + 20% v/v glicerol + 80 mM MES pH 6,5 + acetato de cálcio 160 mM) com obtenção de cristais em forma de lapiz. (C) condição de refinamento: 11,4% de PEG 8000, 20% de glicerol v/v, MES 80 mM pH 6,3 e 160 mM de acetato de cálcio. Proteína concentrada até 35 mg/mL com adição de 20 mM de FAD.

3.2.10 Coleta de dados e difração de raios X

Uma vez obtidos os cristais resultantes do refinamento, vários foram submetidos à exposição a raios X na linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). A coleta de dados foi feita

em uma placa detectora de imagem 2M-Pilatus, com tempo de exposição de 2,0 sec ($\Delta\Phi=0,5^\circ$). Foram coletadas 360 imagens do cristal *CnTrr1*. *CnTrr1* difratou a uma resolução de 2,25 Å. Os padrões de difração de raios X foram integrados numa faixa de 28,00 – 2,25 Å com um total de 1.442.941 reflexões indexadas no grupo espacial $P2_12_12_1$, com as medidas de célula unitária com os eixos $a = 86,140$ Å, $b = 108,828$ Å, e $c = 70,354$ Å, correspondentes a cristais do tipo primitivo ortorrômbico. Após a promediação e escalonamento foram obtidas 30.190 reflexões únicas. Considerando o coeficiente de Matthews $2,07 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ (PM: 39868 Da) para uma porcentagem de solvente de 40,56%, 2 monômeros eram esperados na unidade assimétrica. Os resultados detalhados sobre a coleta de dados do modelo são apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Sumário da coleção de dados de difração de raios X de um cristal único de *CnTrr1*.

Parâmetros cristalográficos	Valores para <i>Trr1</i>
Comprimento de onda (Å)	1,45860
Grupo espacial	$P 2_1 2_1 2_1$
Parâmetros da célula unitária a, b, c (Å) α, β, γ (°)	86,140, 108,828, 70,354 90,00
Distância (mm)	120,9
Mosaicidade (°)	0,8
Número de reflexões	1.442.941
Número de reflexões únicas	30.190
Resolução (Å) ^a	28,00–2,25 (2,29–2,25)
Rmerge ^b	0,135 (0,657)
Media I/σ (I)	15,5 (2,58)
Completeza (%)	99,9 (98,0)
Redundância	5,9 (5,7)

^a Os valores entre parênteses referem-se ao shell de resolução mais alta, de 2.29 – 2.25 Å.

^b $R_{merge} = \sum |I_i - \langle I \rangle| / \sum I_i$, onde I_i é a intensidade de uma reflexão, e $\langle I \rangle$ é a intensidade média dessa reflexão. A camada de resolução mais alta é mostrada entre parênteses.

3.2.11 Substituição molecular e refinamento

Para resolver o problema das fases foi usado o método de substituição molecular ou MR, que consiste em atribuir as fases da estrutura modelo como fases iniciais para a estrutura que desejamos determinar, através do uso da estrutura tridimensional de uma macromolécula parecida com nosso objeto de estudo. A ferramenta BLAST foi utilizada para encontrar a proteína *Trr1* de *S. cerevisiae*

(PDB code: 3ITJ), resolvida a 2,4 Å por Oliveira *et al.*, (2010), com cerca de 71% de identidade com *CnTrr1*. *ScTrr1* foi usada como modelo de busca no programa Phaser.

O mapa de densidade eletrônica inicial, apresentou qualidade suficiente para construir as cadeias polipeptídicas de *CnTrr1* presentes na unidade assimétrica. Inicialmente, a sequência correta dos resíduos foi assignada ao modelo e em seguida a posição dos resíduos foi ajustada manualmente para os dois monômeros (A, B) presentes na unidade assimétrica. A construção das cadeias foi monitorada pelos valores R_{factor} e R_{free} . Foi realizado um primeiro ciclo de refinamento da estrutura com o programa REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997), o qual tinha por objetivo verificar esses valores. O R_{factor} e R_{free} mostram o percentual de erro existente em a estrutura resolvida com relação aos dados experimentais e dão indícios se a substituição molecular teve sucesso. Além disso, foi gerado o mapa de densidade eletrônica que pode ser visualizado através do programa COOT (Emsley e Cowtan, 2004), além de permitir substituir ou adicionar aminoácidos, águas, e a ordenação da molécula no interior do mapa de densidade. A estrutura *CnTrr1* foi finalmente refinada em um processo iterativo com os programas Coot e Phenix com um R_{factor} de 0,164 e um R_{free} de 0,227 (**Tabela 7**).

A estrutura resolvida juntamente com os dados coletados, foi depositada no banco de dados *Protein Data Bank* (Berman *et al.*, 2000), código 5W4C, no entanto ainda não foi disponibilizada para a comunidade científica. A maior parte dos resíduos está localizada e agrupada entre as regiões mais favorecidas de hélice α e folha β ; a qualidade estereoquímica da *CnTrr1* foi estimada utilizando-se o diagrama de Ramachandran resultante da validação pelo aplicativo *Ramachandran Plot Analysis* (RAMPAGE). Os gráficos revelaram que o modelo final da estrutura é aceitável quanto aos ângulos Φ e ψ , com 97,8% dos resíduos presentes nas regiões mais favorecidas e 2,2% encontram-se em regiões permitidas.

Tabela 7. Estatísticas do refinamento da estrutura de *CnTrr1*

Estatísticas do refinamento	
Composição do modelo	
Proteína	694 aa
Água	298
Ligantes	2 FAD, 2 gliceróis, 1 PEG, 3 cálcios, 1 acetato
R_{free}	0,164
R_{factor}	0,227
RMS ligação (Å)	0,07
RMS ângulo (°)	0,883
Análise Ramachandran (%)	
Regiões favorecidas	675 (97,8%)
Regiões adicionalmente permitidas	15 (2,2 %)
Regiões não permitidas	0 (0,0 %)

3.2.12 Estrutura geral da proteína recombinante *CnTrr1*

CnTrr1 é um homodímero, a qualidade do mapa de densidade eletrônica permitiu a modelagem de 356 (14-369) e 338 (14-351) resíduos para os monômeros A e B, respectivamente, de um total de 371 resíduos em cada subunidade. O alinhamento de sequências mostra que *CnTrr1* compartilha uma identidade de sequência de 71%, 64%, 48% e 24%, com as Trr de *S. cerevisiae* (3ITJ), *A. thaliana* (1VDC), *E. coli* (1TDE) e *H. Sapiens* (2CFY, Trr de elevada massa molecular), respectivamente (**Figura 23**). A estrutura geral de *CnTrr1* é muito semelhante à de *S. cerevisiae* Trr1 (código PDB: 3ITJ). A raiz do desvio médio quadrático (rmsd) dos átomos C α das duas estruturas sobrepostas resulta em 1,82 Å. Enquanto que para *A. thaliana*, *E. coli* e *H. sapiens* aumenta para 3,16; 3,38 e 7,08 Å, respectivamente.

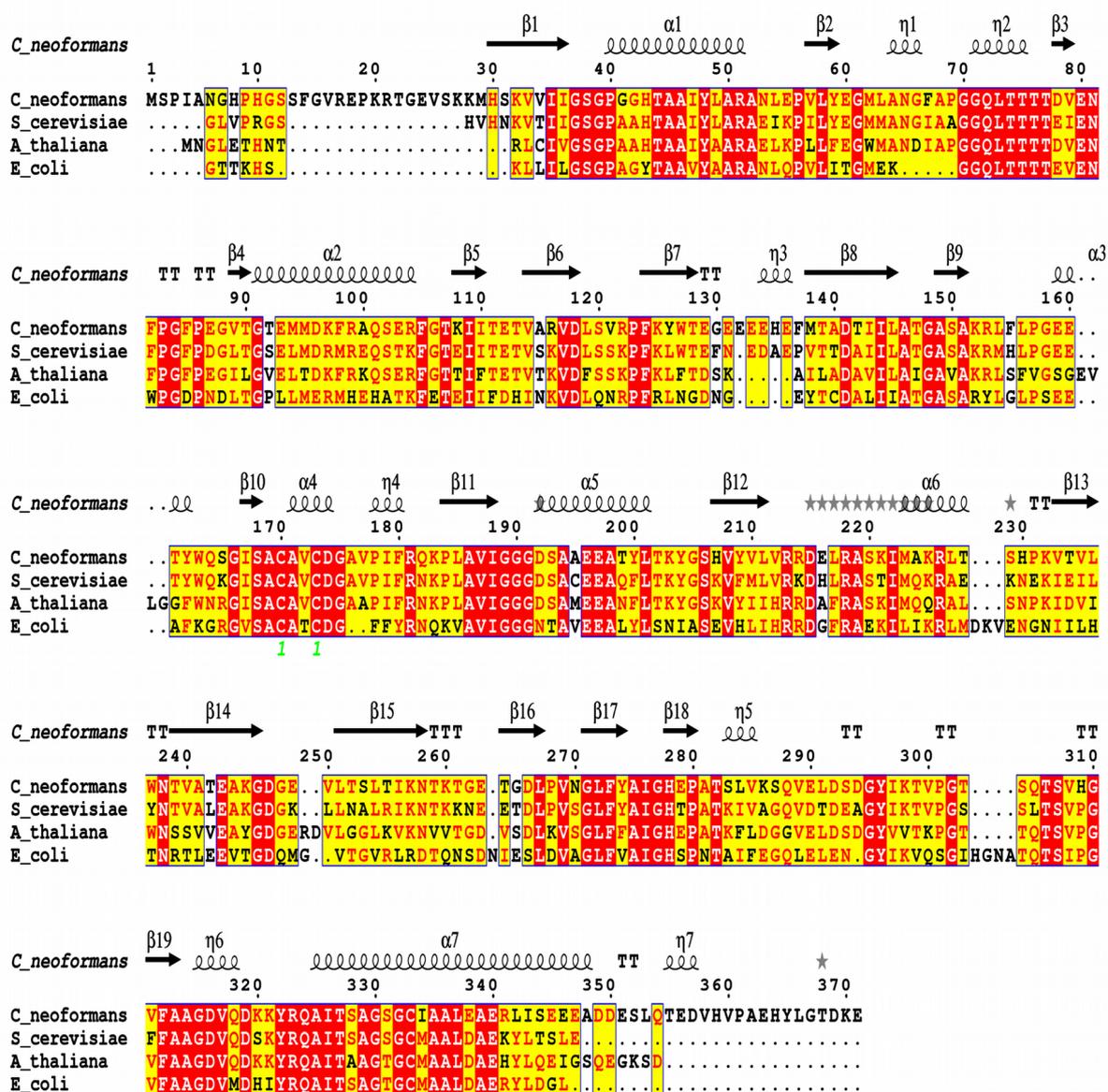


Figura 23. Alinhamento múltiplo realizado entre a sequência da proteína Trr1 de *C. neoformans* (código PDB: 5W4C) e as sequências de outras Trrs com estruturas conhecidas: *S. cerevisiae* (3ITJ), *A. thaliana* (1VDC) e *E. coli* (1TDE). As cisteínas do sítio catalítico absolutamente conservadas são indicadas com o número 1 em verde. Os resíduos idênticos estão em blocos vermelhos, resíduos semelhantes estão em caixas amarelas. Os elementos da estrutura secundária de *CnTrr1* e suas denominações são mostrados acima do alinhamento, α (hélice alfa), β (fita beta), T (voltas) e η (hélice 3_{10}). Os asteriscos acima dos resíduos indicam cadeias laterais que possuem uma segunda posição na estrutura (dupla conformação). O alinhamento foi realizado usando CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 2004) e a figura foi preparada com ESPript (Gouet *et al.*, 1999).

Quando comparada com as L-Trr (isoforma de baixa massa molecular) de outras espécies, a sequência de aminoácidos da enzima de *C. neoformans* é mais longa; as cadeias de polipeptídeos exibem inserções na região N-terminal (Met¹, Ser², Pro³, Ser¹³, Phe¹⁴, Gly¹⁵, Val¹⁶, Arg¹⁷, Glu¹⁸, Pro¹⁹, Lys²⁰,

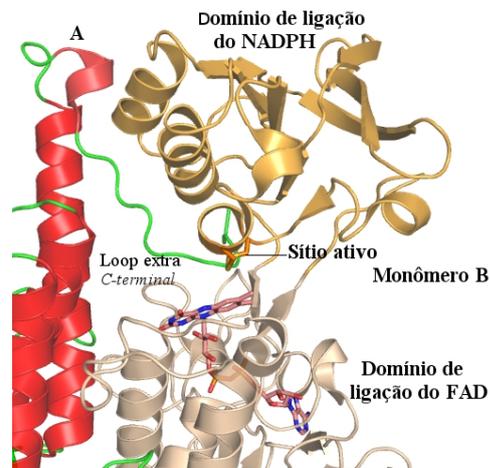
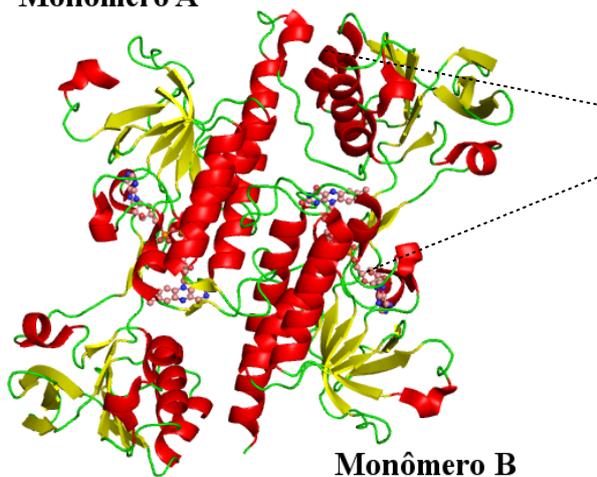
Arg²¹, Thr²², Gly²³, Glu²⁴, Val²⁵, Ser²⁶), uma inserção do resíduo Glu¹³² entre o *loop* β 7/ β 8 e 17 resíduos na região C-terminal (Thr³⁵⁵, Glu³⁵⁶, Asp³⁵⁷, Val³⁵⁸, His³⁵⁹, Val³⁶⁰, Pro³⁶¹, Ala³⁶², Glu³⁶³, His³⁶⁴, Tyr³⁶⁵, Leu³⁶⁶, Gly³⁶⁷, Thr³⁶⁸, Asp³⁶⁹, Lys³⁷⁰, Glu³⁷¹) (**Figura 24A**). No N-terminal de ambos os monômeros os primeiros 13 resíduos não foram identificados na densidade eletrônica, e no C-terminal, os últimos 2 resíduos para o monômero A e os últimos 20 resíduos para o monômero B não puderam ser construídos.

Adicionalmente, uma molécula de FAD foi observada em cada subunidade, enquanto que a densidade eletrônica do NADPH não foi definida. Interessantemente, na estrutura dimérica é observado que o *loop* extra C-terminal da cadeia A (Gln³⁵⁴-Asp³⁶⁹) ocupa o sítio onde o NADPH se liga para interagir com o FAD locado no monômero B. Porém, não existe nenhum estudo que relate a posição desse *loop* extra em L-Trr. Vários estudos têm relatado que o NADPH é desordenado como evidenciado por Akif e cols., (2005) com fatores de temperatura altos (>75 Å²). Finalmente, ao modelo foram adicionados duas moléculas de glicerol, um PEG, e quatro íons. Para a análise mais detalhada, foi escolhido o monômero A por ser mais completo.

Os valores de rmsd para a sobreposição de $C\alpha$ entre os dois monômeros da unidade assimétrica é 0.506 Å. Apesar das diferenças mínimas, os monômeros são praticamente idênticos. Cada monômero é composto por dois domínios que formam os sítios de ligação ao FAD e ao NADPH (Oliviera *et al.*, 2010). O domínio de ligação ao FAD é composto pelos resíduos 14-150 e 277-369. Este domínio tem uma estrutura α/β que compreende uma folhas β com cinco fitas paralelas centrais flanqueadas em um lado por três hélices α e no outro lado por uma folha β de duas fitas. O domínio de ligação ao NADPH que é uma sequência contínua, composta pelos resíduos 151-276, compreende uma folha composta por cinco fitas β paralelas centrais, flanqueadas por três hélices α e três fitas β maiores antiparalelas (**Figura 24B**). Os dois domínios são conectados por duas fitas β atribuídas ao domínio de ligação do FAD (β 9 e β 18) com poucos contatos entre os domínios e preenchida por moléculas de água. O principal contato entre os domínios é causado pelo anel de isoaloxazina do FAD que na conformação oxidada entra em contato com os resíduos do sítio ativo no domínio do NADPH.

A.

Monômero A



B.

Domínio de ligação ao NADPH

e

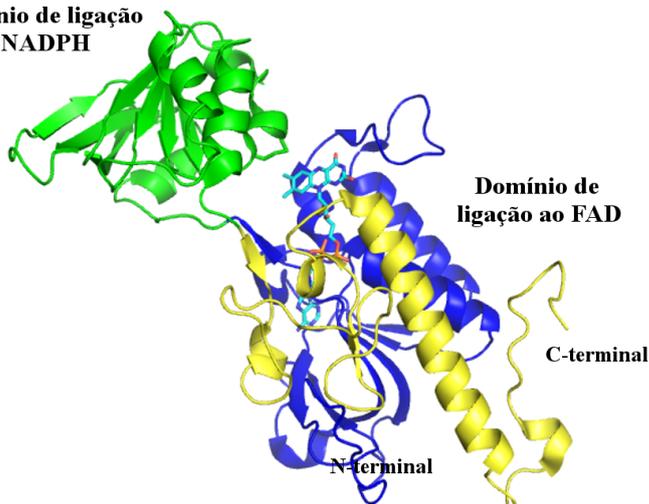


Figura 24. Estrutura geral da *CnTrr1*. (A) *CnTrr1* composta por dois monômeros (A e B), mostrando o *loop* extra C-terminal do monômero A. (B) Estrutura do monômero A. Domínio de ligação ao FAD em azul e amarelo domínio de ligação ao NADPH em verde. A região N- e C-terminal são indicadas no modelo. A molécula de FAD encontra-se em ciano.

3.2.13 Sítio ativo

Os resíduos de cisteína Cys¹⁷⁰ e Cys¹⁷³ do sítio ativo conservado de L-Trr, estão localizados na hélice α_4 no domínio de ligação do NADPH. Os sítios de ligação ao NADPH e ao FAD são vicinais durante todo o ciclo catalítico de forma semelhante à glutationa redutase (GR), porém na GR, os resíduos ativos de cisteína estão localizados no domínio do FAD (Schulz *et al.*, 1978). Os resíduos de cisteína em leveduras e plantas são localizados na sequência Cys-Ala-Val-Cys.

A distância de 2,04 Å entre os dois S_γ dos resíduos de Cys mostra que *CnTrr1* encontra-se na forma oxidada (FO), permitindo a oxidação da flavina pela ligação S-S (**Figura 25**). O anel tricíclico de isoaloxazina do FAD contra a ponte dissulfídica é encontrado a uma distância de 3,58 Å, esta

conformação de oxidação de flavina permite a transferência de elétrons do cofator para o dissulfeto. Semelhante a outras Trrs na conformação oxidada (FO), o átomo S de Cys¹⁷³ está mais próximo do anel de isoaloxazina, enquanto que a Cys¹⁷⁰ está mais distante (5,0 Å), e conforme relatado, na conformação FO, o dissulfeto do sitio ativo está enterrado entre os domínios, não é acessível a moléculas de água e, portanto, não é acessível ao substrato tioredoxina. Segundo Lennon e Williams, uma grande rotação do domínio de ligação ao NADPH em *E. coli* é necessária para expor o local ativo (Cys¹³³ -*E. coli*) para interagir com o substrato. Esta conformação tem sido chamada de estado reduzido ou FR, uma vez que permite a redução da flavina pelo NADPH (Lennon e Williams, 1996).

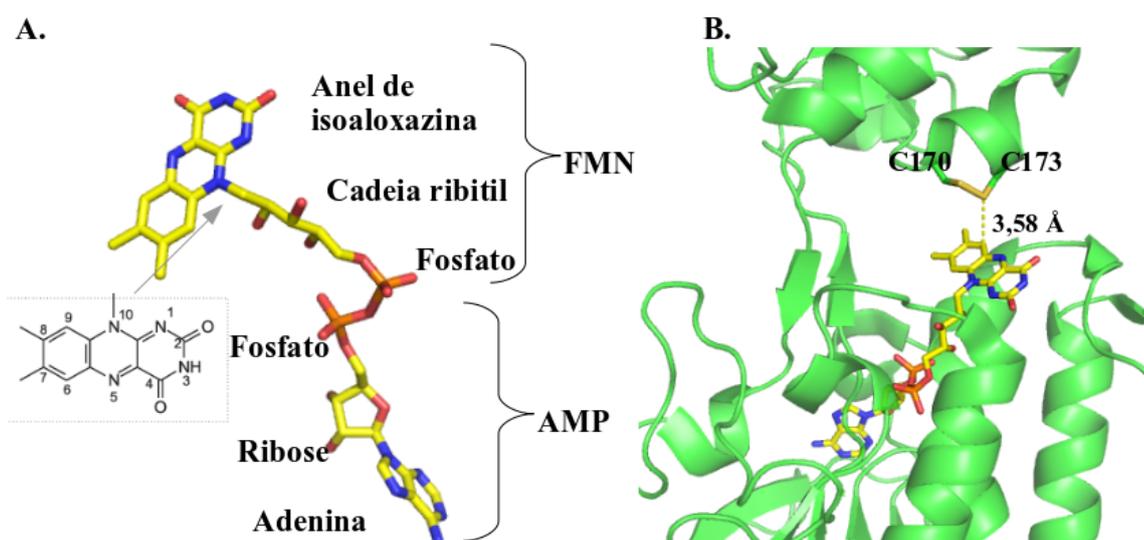


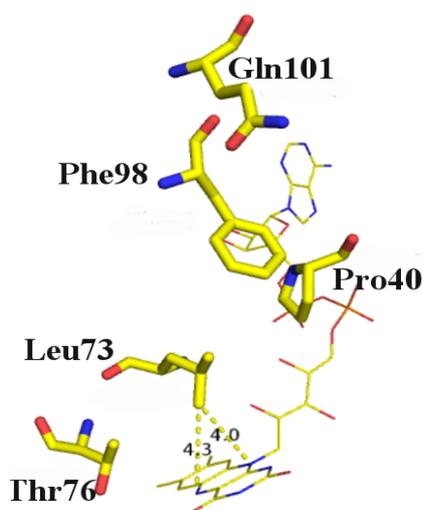
Figura 25. Sitio ativo da tioredoxina redutase oxidada. (A) Composição da flavina adenina dinucleotídeo (FAD), FMN: flavina mononucleotídeo e AMP: adenosina monofosfato (B) Dissulfeto intramolecular formado entre Cys¹⁷⁰ e Cys¹⁷³ (enxofres em amarelo), e a molécula de FAD (carbonos em amarelo, átomos de N estão representados em azul, átomos de O em vermelho e os átomos de P representados em laranja). Sitio ativo de *CnTrr1* com o posicionamento dos dissulfetos em contato com o anel de isoaloxazina do FAD (distância de 3,58 Å).

Na *CnTrr1* a molécula de FAD é estabilizada pelas interações com os resíduos, Ser³⁸, Gly⁴¹, Phe⁶⁷, **Gln**⁷², Leu⁷³, **Asn**⁸¹, Val¹¹⁴, Ala¹⁴⁹, **Asp**³¹⁶, **Gln**³²⁴, Ala³²⁵, Ser³²⁸ formando ligações de hidrogênio. Essas interações são bastante semelhantes à Trr1 de *S. cerevisiae*, onde Pro¹³, Glu³³, **Gln**⁴⁵, **Asn**⁵⁴, Gln¹³⁶, **Asp**²⁸⁸ e **Gln**²⁹⁶ estabilizam a molécula (Oliveira *et al.*, 2010). Os resíduos equivalentes estão em negrito.

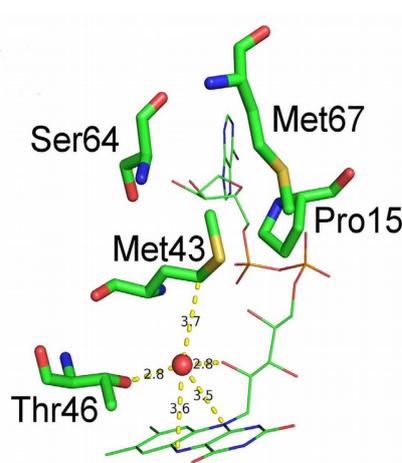
Mesmo que vários resíduos na face do anel isoaloxazina estejam conservados entre Trr, algumas diferenças sutis e cruciais no ambiente local são observadas. Em *CnTrr1* a Leu⁷³ aparece por ser conservada em leveduras, plantas e bactérias, mas na bactéria *L. lactis* este resíduo é substituído por

uma Met⁴³ com uma molécula de água centrada no anel de isoaloxazina. A molécula de água está em contato com o resíduo Thr⁴⁶ (2,8 Å), e a distância desde a molécula de água à isoaloxazina é 3.5 e 3.6 Å (Skjoldager *et al.*, 2017). Em contraste, Leu⁷³ em CnTrr1 é centrada na face da isoaloxazina a uma distancia de 4,3-4,0 Å desde o C₈ aos átomos N5 e N10, respectivamente. Adicionalmente foi encontrado o resíduo volumoso Phe⁹⁸, que é substituído por uma Ser⁶⁴ em LtTrxR e uma Met⁶⁶ em EcTrxR, e uma Pro⁴⁰ conservada (em similar posição -Pro¹⁵ em LtTrxR e EcTrxR). Assim, é observado que a Leu⁷³ em CnTrr1 bloqueia a presença de moléculas de água na face da isoaloxazina (**Figura 26**).

A.



B.



C.

<i>C. neoformans</i>	Pro40	Leu73	Thr76	Phe98	Gln101
<i>L. lactis</i>	Pro15	Met43	Thr46	Ser64	Met67
<i>E. coli</i>	Pro	Leu	Thr	Met	His
<i>S. aureus</i>	Pro	Met	Thr	Ser	Met
<i>M. tuberculosis</i>	Pro	Leu	Thr	Met	Gln
<i>S. cerevisiae</i>	Pro	Leu	Thr	Met	Gln
<i>A. thaliana</i>	Pro	Leu	Thr	Phe	Gln
<i>E. histolytica</i>	Pro	Leu	Thr	Tyr	Gln

Figura 26. Resíduos ao redor da face do anel isoaloxazina de FAD. (A) em CnTrr1 Leu⁷³ é substituída por um resíduo de Met em *L. lactis*. Leu⁷³ é locado na face do anel de isoaloxazina e restringe o acesso devido ao impedimento estérico. (B) LtTrxR tem um bolso na face do anel de isoaloxazina ocupado por uma molécula de água (esfera vermelha). (C) Alinhamento de resíduos específicos que encontram se posicionados perto da face do anel de isoaloxazina. *Cryptococcus neoformans* (5W4C); *Lactococcus lactis* (5MH4); *Escherichia coli* (1CL0); *Staphylococcus aureus* (4GCM); *Mycobacterium tuberculosis* (2A8X); *Saccharomyces cerevisiae* (3ITJ); *Arabidopsis thaliana* (1VDC); *Entamoeba Histolytica* (4A5L).

3.2.14 *CnTrr1* uma flavoproteína dimérica

O dímero cristalográfico de *CnTrr1* tem uma interface que desempenha um papel auxiliar na formação do complexo (CSS calculado em Pisa é 0,454). A área da interface da estrutura cristalográfica é de aproximadamente 2600 Å² (15% da área de superfície enterrada). Na *CnTrr1*, a área de interface pode ser dividida em seis regiões: dois envolvendo contatos entre o domínio do NADPH de um monômero com o domínio do FAD do outro monômero indicadas nos círculos 3 e 4 na molécula na **Figura 27**; e as outras quatro regiões interagindo entre os domínios FAD de ambas as cadeias indicadas nos círculos 1, 2, 5 e 6 na molécula na **Figura 27**.

As interações na interface envolvem 46 ligações de hidrogênio, e 13 pontes salinas envolvendo principalmente os resíduos Arg (NH1, NH2) e Glu (OE1, OE2). A maioria das interfaces são contribuídas pelos domínios de ligação ao FAD. Há um núcleo hidrofóbico formado entre os resíduos Gly^{302A}-Tyr^{322B} e Tyr^{322A}-Gly^{302B} e Glu^{338B} (*loop* 1 e 2), e Tyr⁴⁸-Gln³²⁴, Phe⁸²-Gln¹⁰¹, Gly⁸⁴-Gln¹⁰¹, Phe⁸⁵-Gln¹⁰¹, Pro⁸⁶-Arg¹⁰⁴, Tyr³⁶⁵-Gln³²⁴ (*loop* 5 e 6). Os resíduos Glu³⁶³, Tyr³⁶⁵, Leu³⁶⁶, Gly³⁶⁷, Thr³⁶⁸ e Asp³⁶⁹ do *loop* extra C-terminal do monômero A estão envolvidos na formação de ligações de hidrogênio com os resíduos Gln³²⁴, Asn⁸¹, Arg³²³, Gly²⁷⁷ e His²⁷⁸ no domínio do FAD, e os resíduos no domínio do NADPH, Ser¹⁹³, Asp¹⁹², Gly¹⁹⁰ e Ala¹⁹⁴ (*loop* 3) do monômero B. O *loop* 4 envolve os resíduos do monômero A: Asp³⁵⁰, Leu³⁵³ e Thr³⁵⁵, que interagem com os resíduos do outro monômero no domínio do NADPH (Arg²²⁶, Ser²²⁹). Todos as três hélices α no domínio de ligação ao FAD (α 1, α 2 e α 7) são envolvidas em interações entre monômeros.

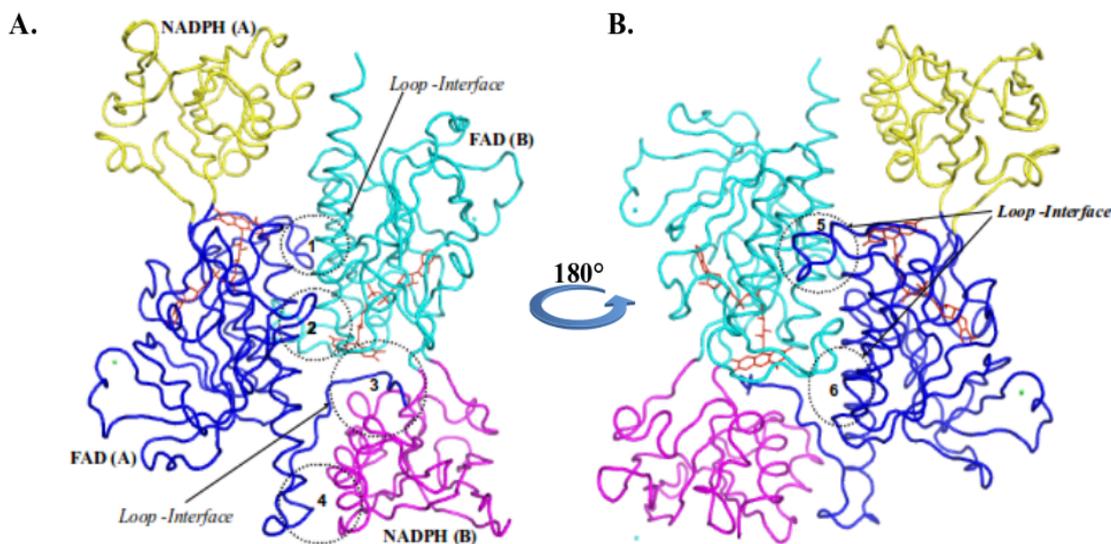


Figura 27. Dímero da enzima *CnTrr1*. A estrutura com seus dois domínios em cada monômero é indicada em amarelo (domínio de NADPH) e azul (domínio de FAD) para o monômero A, e magenta (domínio de NADPH) e ciano (domínio de FAD) para o monômero B. O diagrama mostra duas vistas: A (vista lateral) e B (vista rotacionada 180 graus). Seis regiões de interface são destacadas com círculos numerados de 1 a 6. As regiões 1 e 2 envolvem contatos entre os domínios de FAD de um monômero com o domínio de FAD do outro monômero. As regiões 3 e 4 envolvem contatos entre o domínio de NADPH de um monômero com o domínio de FAD do outro monômero. As regiões 5 e 6 envolvem contatos entre os domínios de FAD de ambas as cadeias. As rotulações 'Loop-Interface' apontam para as regiões 1 e 2. Um símbolo de seta curva com '180°' indica a rotação entre as duas vistas.

ciano (domínio de FAD) para o monômero B. **(A)** Os 4 círculos indicam as regiões de contato ou interfaces. Os dois círculos pontilhados centrais são envolvidos na formação dimérica de Trr. **(B)** Dímero rotado 180° ao redor do eixo perpendicular ao eixo de simetria da molécula, mostrando dois círculos pontilhados envolvidos na formação do dímero. As 2 moléculas de FAD são indicadas em vermelho.

3.2.15 Ligação ao FAD

A molécula de FAD abrange uma área de aproximadamente 1000 Å² dos quais 907 Å² estão em interface com a proteína, com >90% da área enterrada. Assim, a molécula de FAD é fechada entre os domínios. O mononucleótido de flavina (FMN) é quem contata a maioria de resíduos através das ligações de hidrogênio (**Tabela 8**). Os grupos amina da cadeia principal dos resíduos Gly⁴¹ e Asp³¹⁶ das hélices α1 e a 3₁₀ apontam para os grupos fosfato (O1P e O2P). A isoaloxazina gera uma ligação de hidrogênio entre o N3 e OD1 da Asn⁸¹. As interações com O2, O4 e N5 são mediadas por águas. Em geral o anel encontra-se interagindo com aminoácidos polares, e as interações hidrofóbicas são mediadas pela Val⁷⁹ e Ala³²⁵. Na região AMP (adenosina monofosfato) a Ser³⁸ faz uma ligação de hidrogênio do grupo hidroxilo (OG) com O3B e, Val¹¹⁴ (O e N) com N6A e N1A do AMP. As interações do FAD são muito similares à *ScTrr1* (3D8X) e à *ArTrxR* de *A. thaliana*. Há diferença é encontrada nos resíduos Leu⁷³, Ala¹⁴⁹ e Ser³²⁸ em *CnTrr1* formando três ligações de hidrogênio a mais. Nenhum dos resíduos do *loop* extra em *CnTrr1* estão associados com essas interações.

Embora Dai e cols., (1996) afirmarem que a estrutura oxidada da enzima de *A. thaliana* e o seu dissulfeto estão em contato van der Waals com o anel de isoaloxazina (Cys¹³⁸ está em contato com C4A, N5 e N10, enquanto que o SG da Cys¹³⁵ está longe do anel), nossas observações sugerem que Cys¹⁷³ está em contato com C6 do anel em uma distância 3,6 Å, enquanto que os outros átomos do anel apresentam uma distância substancialmente maior a 4,0 Å (**Tabela 8**).

Tabela 8. Interações da *CnTrr1* com o FAD menores que 4,0 Å

Ligações de hidrogênio Átomos	<i>C. neoformans</i>	<i>Resíduos homólogos</i>	
		<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. thaliana</i>
O3B (ribose)	Ser38- OG	Ser11	Ser13
O2P (fosfato)	Gly41- N	Ala14	Ala16
O1A; O2A (fosfato)	Gln72 - N; NE2	Gln45	Gln42
O2' (ribitol)	Leu73 - N	Leu46	-
N3 (isoaloxazina)	Asn81- OD1	Asn54	Asn51
N6A (adenina)	Val114- O	Val87	Val84
O2A (fosfato)	Ala149- N	-	-
O1P;O3' (fosfato) (ribitol)	Asp316- N; OD2	Asp288	Asp286

O2;O3' (isoaloxazina) (ribitol)	Ala325- N; N	Ala297	Ala295
O3' (ribitol)	Ser328- OG	-	-
O2 (isoaloxazina)	H₂O	-	H ₂ O
N5 (isoaloxazina)	H₂O	-	H ₂ O
O4 (isoaloxazina)	H₂O	H ₂ O	H ₂ O
Interações de van der Waals (isoaloxazina + dissulfeto)			
C6	Cys173 SG, 3.6 Å	-	-
C5	*	Cys145 SG, 3.3 Å	-
C9A	*	Cys145 SG, 3.4 Å	-
N5	*	Cys145 SG, 3.2 Å	-
C10	*	Cys145 SG, 3.2 Å	-
C4A	*	Cys145 SG, 3.1 Å	Cys138 SG, 3.2 Å
N10	*	Cys145 SG, 3.3 Å	Cys138 SG, 3.4 Å

* interações superiores a 4,0 Å

3.2.16 Comparação de *CnTrr1* com Trr de baixa massa molecular (L-Trr)

Quando os domínios do FAD de *C. neoformans* e *S. cerevisiae* são superpostos, o domínio do NADPH de *CnTrr1* faz uma rotação de aproximadamente 24° para se alinhar com o domínio da *ScTrr1* (*UCSF Chimera*) (Pettersen *et al.*, 2004). Porém, essa rotação não é suficiente para que o sitio ativo de *CnTrr1* fique exposto. Embora na *ScTrr1* existe uma rotação ligeira de 8° do domínio do NADPH quando superposto com o domínio de *EcTrxR*, essa é uma característica resultante de um comportamento dinâmico das L-Trr (Dai *et al.*, 1996). O rmsd dos dois domínios correspondentes entre *CnTrr1* e *ScTrr1* é de 0,447 Å para o domínio de NADPH (101 átomos C α) e para o domínio de FAD é de 0,417 (167 átomos C α). A maioria das diferenças é encontrada em algumas regiões: 1. o *loop* extra da *CnTrr1* na região N-terminal (Met¹-Ala⁵; Phe¹⁴-Lys²⁸) formado principalmente de resíduos polares e hidrofóbicos, mas, sem qualquer evidência na literatura sobre essa região em Trr de baixo peso molecular. 2. uma inserção na posição 135 (His), gerando uma pequena hélice adicional constituída por 5 aminoácidos EEHEF, que quando alinhados com a *ScTrr1* (DA-EP) representam um *loop* diferente, é que na literatura é reportada como sítio de ligação com a Trx (Zhang *et al.*, 2008). 3. o *loop* extra na região C-terminal, constituído por 22 aminoácidos (Ala³⁴⁸-Asp³⁶⁹), a maioria representados por resíduos com cargas negativas e hidrofóbicos e que são associados na interação com o outro monômero no domínio de NADPH (**Figura 28**).

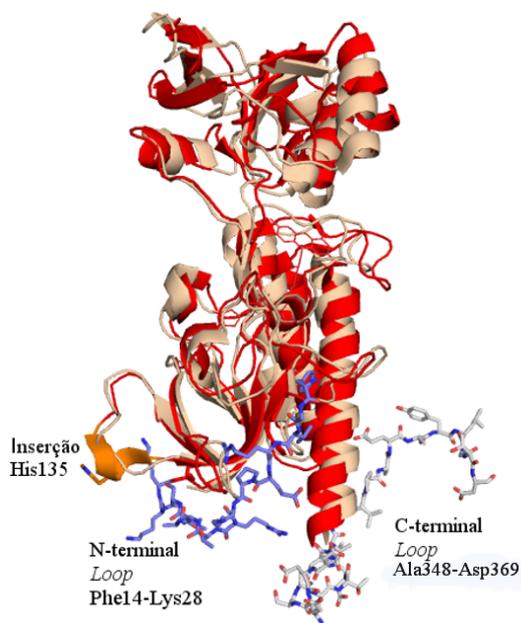


Figura 28. Superposição dos monômeros da *CnTrr1_{ox}* (vermelho) e *ScTrr1_{ox}* (rosa). A formação dos *loops* é mostrada em bastões e identificados com cores diferentes: hélice laranja para inserção His¹³⁵, carbonos brancos para o C-terminal e azuis para o N-terminal.

Adicionalmente, segundo Zhang, e cols., uma ligação de hidrogênio é formada entre o grupo amino da Thr⁵⁰ e a cadeia lateral da Gln¹³⁶ na Trr1 de *S. cerevisiae*. Porém os dois resíduos Thr⁷⁷ e Gln¹⁶⁴ equivalentes na *CnTrr1* encontram-se a uma distância maior que 10 Å. Adicionalmente, a região conservada de treoninas (hélice 3₁₀ entre folhas β2 e β3) no domínio de ligação do FAD, não forma ligações de hidrogênio entre os dois domínios como relatado em estudos prévios que confirmam esse tipo de ligação em todas as Trr de estrutura conhecida (Zhang *et al.*, 2008).

Quando alinhamos *CnTrr1* com TrxR de *E. coli*, as maiores diferenças ocorrem no domínio do FAD. 1. o *loop* extra no N-terminal (Glu¹⁸-Met²⁹); 2. um *loop* constituído pelos resíduos Tyr⁵⁹-Pro⁶⁹, com a inserção de 5 aminoácidos (Leu⁶³, Ala⁶⁴, Asn⁶⁵, Gly⁶⁶, Phe⁶⁷); 3. um *loop* compreendendo 12 resíduos (Trp¹²⁷-Met¹³⁸) devido à inserção dos resíduos Glu¹²⁹, Gly¹³⁰, Glu¹³⁶, Phe¹³⁷, Met¹³⁸; 4. e o *loop* extra da região C-terminal da *CnTrr1* com a inserção de 23 resíduos (Glu³⁴⁷-Asp³⁶⁹). Todos os *loops* são mais longos do que aqueles em *EcTrxR*. Os resíduos do *loop* 2 são aparentemente conservados em Trr de eucariótos como leveduras e plantas, enquanto nas bactérias há um *loop* mais curto (Dai *et al.*, 1996). No *loop* 3, a maioria dos resíduos são carregados negativamente e os restantes são hidrofóbicos, gerando uma superfície potencial negativa ao redor desse *loop*, em contraste com *EcTrxR*. Em relação ao *loop* no C-terminal, mais longo em *CnTrr1*, este forma uma hélice α mais longa que muda de direção à região de dimerização (**Figura 29**).

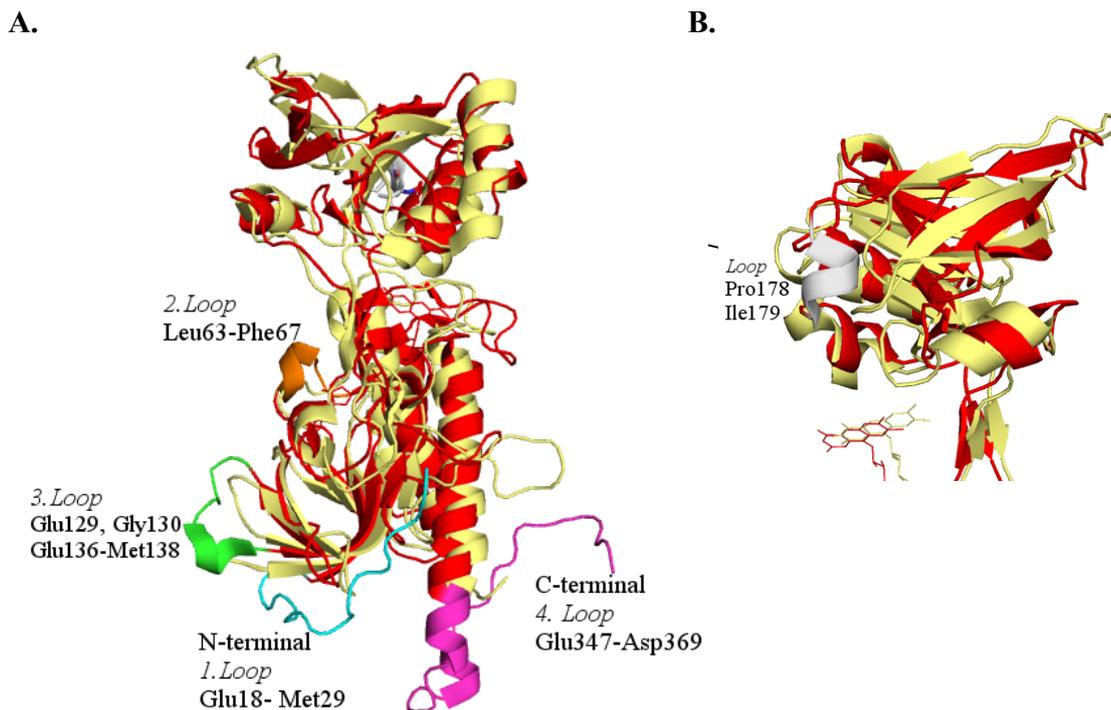


Figura 29. Superposição dos monômeros de *CnTrr1*_{ox} e *EcTrxR*_{ox}. (A) Formação dos 5 loops no domínio do FAD identificados por cores diferentes. (B) Formação do loop no domínio NADPH (cinza) quando comparadas às duas estruturas oxidadas. Trr1 de *C. neoformans* é mostrada em vermelho e TrxR de *E. coli* é mostrada em amarelo.

Finalmente, no domínio de NADPH, apresenta-se a maior diferença entre os resíduos Ala¹⁷⁶-Leu¹⁸⁵, com a inserção dos resíduos Pro¹⁷⁸ e Ile¹⁷⁹ na *CnTrr1* (**Figura 29B**). Em *E. coli* este loop forma uma região hidrofóbica com dois resíduos de Phe, que se encaixam no bolsão hidrofóbico da *EcTrx1* (complexo *EcTrxR*-Trx1) (Lennon *et al.*, 2000). Mas, em *CnTrr1*, estes resíduos são substituídos por Val¹⁷⁷ com uma cadeia lateral mais curta e Pro¹⁷⁸, que formam uma região de resíduos altamente conservados em leveduras (Ala-Val-Pro-Ile-Phe).

3.2.17 Resíduos conservados nas Trr

A comparação da estrutura primária de Trr de várias espécies fúngicas e plantas, indica que a maioria destas deve ter uma estrutura tridimensional muito similar. Os resíduos conservados foram divididos em grupos: os envolvidos no sítio de ligação ao FAD, no sítio de ligação ao NADPH e no sítio ativo.

Os sítios de ligação ao cofator FAD são altamente conservados. Vários destes resíduos são conservados para acomodar os cofatores (Dai *et al.*, 1996). Quase metade dos resíduos conservados são glicinas, muitas das quais estão localizadas nos sítios de ligação dos cofatores (glicina 37, 39, 61, 70,

71, 84, 91 106, 148, 277, 301, 310 e 315 no domínio de FAD e glicina 148, 166, 175, 189, 190, 191, 246 e 271 no domínio de NADPH). A alanina é outro resíduo altamente conservado, Ala¹⁹⁴ e Ala¹⁹⁸ localizadas na hélice $\alpha 5$, são identificadas na ligação ao fosfato no domínio de ligação ao NADPH em *E. coli*. Especificamente mutações sítio-dirigidas na Ala¹⁹⁴ (A179 em *E. coli*) conferem especificidade pela coenzima NADP⁺; o efeito da introdução de um resíduo de Gly nesta posição (A179G) teve uma queda dramática do K_m do NADPH (Scrutton *et al.*, 1990).

Devido a que o cofator NADPH não foi identificado na densidade eletrônica de *CnTrr1_{ox}*, não foi possível observar os resíduos conservados localizados perto deste cofator. Entretanto resultados de estudos em *E. coli* indicam que o sítio de ligação ao NADPH contém vários resíduos de arginina conservados, localizadas perto dos sítios de ligação do fosfato, porém não há resíduos de argininas conservadas ao redor dos sítios de ligação ao fosfato em FAD (Dai *et al.*, 1996). Em Trr de fungos e plantas Arg¹⁵³ é encontrada no domínio de ligação ao NADPH, e é altamente conservada. Quando comparamos com outras espécies (bactérias e mamíferos) existe uma tirosina na posição correspondente à Arg. No mesmo sentido observamos que enquanto a Arg¹¹⁷ (posição 152 em *Cn*) é bem conservada entre todas as espécies, em fungos e plantas há uma lisina ocupando essa posição, que continuaria gerando um ambiente positivo ao redor dessa região.

Somente um dos resíduos da ligação ao FAD é totalmente conservado entre espécies, Asp³¹⁶, que liga o N e o grupo carboxilo OD2 ao O1P e O3' do FAD, respectivamente. Outros resíduos como: Leu⁷³, Asn⁸¹, Ala¹⁴⁹ e Ala³²⁵ apresentam-se conservados só nas L-Trr e revestem com a sua hidrofobicidade um lado do anel de isoaloxazina. O alinhamento de sequência do sítio ativo revela que os resíduos deste sítio são altamente conservados, exceto que há um resíduo de treonina entre as duas cisteínas redox-ativas em procariotos, e em humanos uma tirosina, comparado com a valina em fungos e plantas (V¹⁷² em *CnTrr1*, CAVC). Vários dos resíduos na área de interação dimérica são também altamente conservados entre fungos e plantas como: Tyr⁴⁸, Gly⁸⁴, Phe⁸⁵ e Gly³⁰².

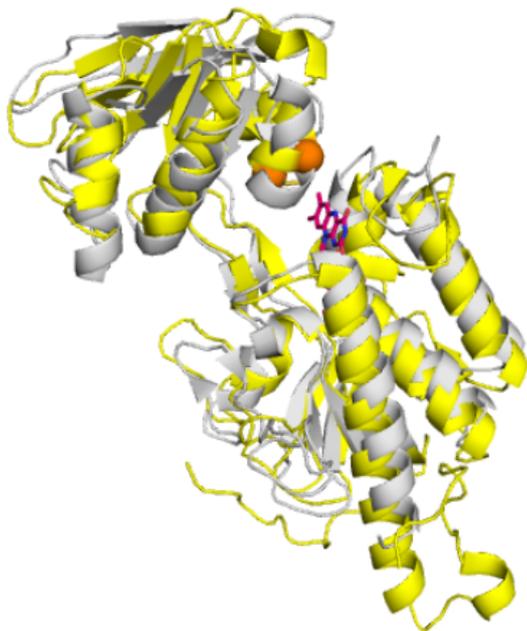
3.2.18 Modelo da *CnTrr1* na conformação reduzida

Atualmente, não existe no PDB cristais difratados da Trr1 na conformação oxidada ou reduzida de fungos patogênicos, por isso a construção do modelo reduzido (FR) foi feita com o software MODELLER usando como molde 1F6M da TrxR de *E. coli* que possui em torno 47% de identidade. A primeira análise das informações das posições corretas dos ângulos diedros modelados e que forneceu uma medida da qualidade, foi a análise dos ângulos *phi* e *psi*. O resultado do gráfico de Ramachandran revelou que o melhor modelo foi o modelo_5 apresentando 94,0 % dos aminoácidos em regiões mais

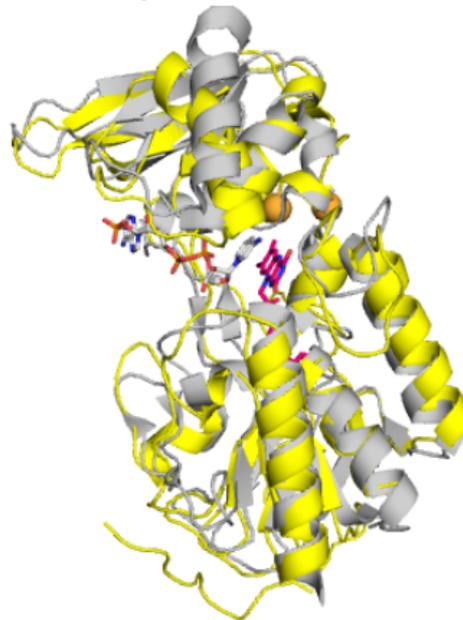
favorecidas (valores próximos ao do cristal) e 5,4 % em regiões não permitidas. O modelo na conformação FR apresentou um Q-mean de -1,26. Além disso, o modelo apresentou em torno de 80,3 % dos aminoácidos com uma média 3D-1D $> 0,2$ aprovando a confiabilidade do enovelamento. Para considerar a qualidade do modelo satisfatória é necessário que pelo menos 80% dos resíduos possua um “Score 3D-1D” acima de 0,2 (<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>) (Bowie *et al.*, 1991).

Com a superposição do domínio do FAD, observa-se uma rotação de aproximadamente 38° entre os domínios do NADPH da *CnTrr1* e *EcTrxR*. Quando aplicada esta rotação deixando o domínio do FAD fixo, o anel de AADP+ de *EcTrxR* se aproxima ao anel de isoaloxazina da *CnTrr1*. O átomo C4 da nicotinamida em contato com o átomo N5 da isoaloxazina, têm sido relatados por serem responsáveis pela transferência do hidreto entre os dois dinucleotídeos (Blackenhorn, 1976). A superposição das formas reduzidas, resultou em um RMSD de 1,67 Å para 260 átomos de carbonos α alinhados (**Figura 30**).

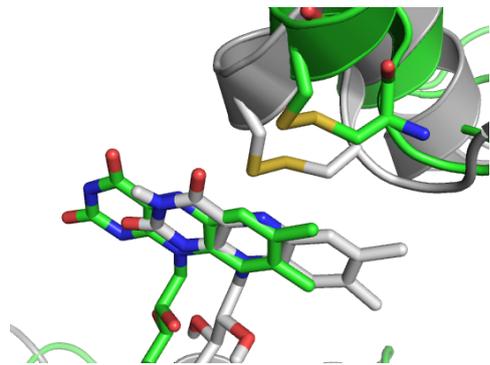
A.
Conformação FO



B.
Conformação FR



C.



D.

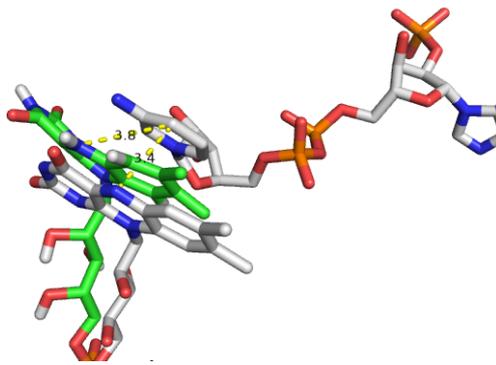


Figura 30. Superposição *CnTrr1* e *EcTrxR*, conformação FO e FR. (A) superposição de *CnTrr1* (amarela) e *EcTrxR* (cinza, PDB 1TDE) na conformação oxidada (FO) e, (B) conformação reduzida (FR), com valores de RMSD de 1,67 Å. Em ambas as conformações o FAD (violeta) foi alinhado. O NADPH (branco) da *EcTrxR* na conformação FR se aproxima ao anel do FAD após mudança conformacional. As cisteínas do sítio ativo são marcadas em esferas laranja. (C) conformação oxidada indicando a orientação do FAD para o sítio ativo (em verde molécula da *CnTrr1* (FAD e as cisteínas oxidadas) em cinza molécula da *EcTrxR*). (D) conformação reduzida indicando a orientação do FAD (verde e cinza da *CnTrr1* e *EcTrxR*, respectivamente) com a AADP da *EcTrxR* (cinza). As linhas amarelas pontilhadas são as distancias entre o C4 da 3-aminopiridina e o N5 do FAD.

O modelo reduzido gerado foi submetido a simulações de dinâmica molecular, que permite a minimização de energia, observando o comportamento do modelo em solução aquosa e verifica alguns parâmetros como estabilidade e alteração estrutural secundária no decorrer do tempo. Na **Figura 31** são apresentados os resultados do desvio médio quadrático (rmsd) dos domínios da proteína ao longo da simulação. Essa medida permitiu verificar o quanto a *Trr1* reduzida se deslocou ao longo do tempo em relação às suas coordenadas iniciais. A DM da apoproteína, mostra que o modelo apresenta uma estabilidade entre 55 e 85 nm. Na trajetória da conformação reduzida da holoenzima existe uma zona mais estável até os 80 ns, porém ao final da trajetória o valor de rmsd começa a subir, sugerindo a existência de mais uma conformação.

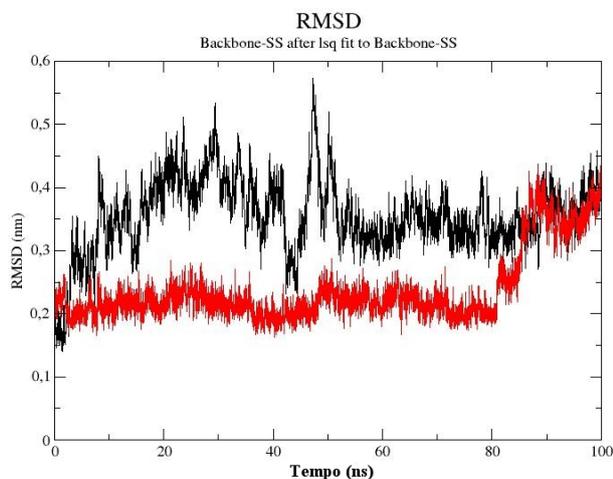


Figura 31. Desvio médio quadrático (rmsd) do modelo FR da *CnTrr1* gerado ao longo da DM, em 100 ns. DM sem FAD (apoproteína) em preto e DM com FAD (holoproteína) em vermelho com com um RMSD em torno de 0,2 nm.

A estrutura secundária do modelo na conformação FR revelou que algumas regiões formaram *loops*. Algumas regiões no domínio de ligação ao NADPH merecem destaque como: Gly⁵⁸-Tyr¹⁶² (que na conformação FO forma a hélice α 3), e Gly¹⁶⁶-Ser¹⁶⁸ (que na conformação FO forma a β 10). No domínio de ligação ao FAD as regiões: Ala⁶⁴-Phe⁶⁷ e Glu¹³⁴-Glu¹³⁶ de tipo hélices 3_{10} são interrompidas pelo predomínio de *loops*, lembrando que estas regiões em L-Trr apresentam *loops* mais longos do que a TrxR de *E. coli*. Finalmente as duas fitas (β 9 e β 18) que conectam os domínios também perderam a sua estrutura na sobreposição das estruturas secundárias. Apesar das mudanças encontradas o modelo não se desestabilizou e manteve as principais características estruturais, como o sítio ativo, a região hidrofóbica AVPI, e a maior parte das estruturas secundárias.

O modelo reduzido FR (Trr1_{red}) após a DM prevê uma curvatura da flavina. Os cálculos teóricos relatados por outros autores supõem uma curvatura do anel de 15-28° para isoaloxazinas reduzidas protonadas em N1. Dixon e cols., estimaram com o cálculo dos orbitais moleculares que apenas 1-2 kcal/mol são necessários para aumentar o ângulo de inclinação para 30° e são necessários 4 kcal/mol para atingir a planaridade (Dixon *et al.*, 1979). Lennon e cols., relataram que a redução da TrxR de *E. coli* após cristalização, faz que o anel de isoaloxazina do cofator FAD, que é essencialmente plano na enzima oxidada (Waksman *et al.*, 1994), assuma uma curvatura de 34° sobre o eixo N5 e N10 na *EcTrxR* reduzida (Lennon *et al.*, 1999). O modelo reduzido da holoproteína com a inclinação da flavina é mostrado na **Figura 32**, o anel central da isoaloxazina parece adotar uma conformação de “barco” com os átomos do anel que contem N3 e N1 deslocados. O movimento do C2', como foi relatado por Lennon *et al.*, (1999) quando as reorientações ocorreram durante o refinamento da estrutura em *E. coli*, formou interações de hidrogênio entre o O(2') e a carbonila de Arg²⁹³, e entre O(2') e N(1), ambos presumivelmente estabilizam a nova curvatura do anel de isoaloxazina. Em *CnTrr1* o modelo FR revelou várias semelhanças entre a Arg²⁹³ e Arg³²³ em *CnTrr1*, que permitiu a formação de novas ligações de hidrogênio entre O(2) e H(1) e o esqueleto carbonila deste aminoácido. A interação de O(2) e O(4) no anel com o grupo amida da Gln³²⁴ NE(2) e o Glu⁸⁰ (N) também levaram a formar ligações de hidrogênio. Embora a cadeia lateral ribitol do FAD apresentou novas interações na conformação FR em *EcTrxR*, em *CnTrr1* a reorganização das posições não levou à formação de novas ligações.

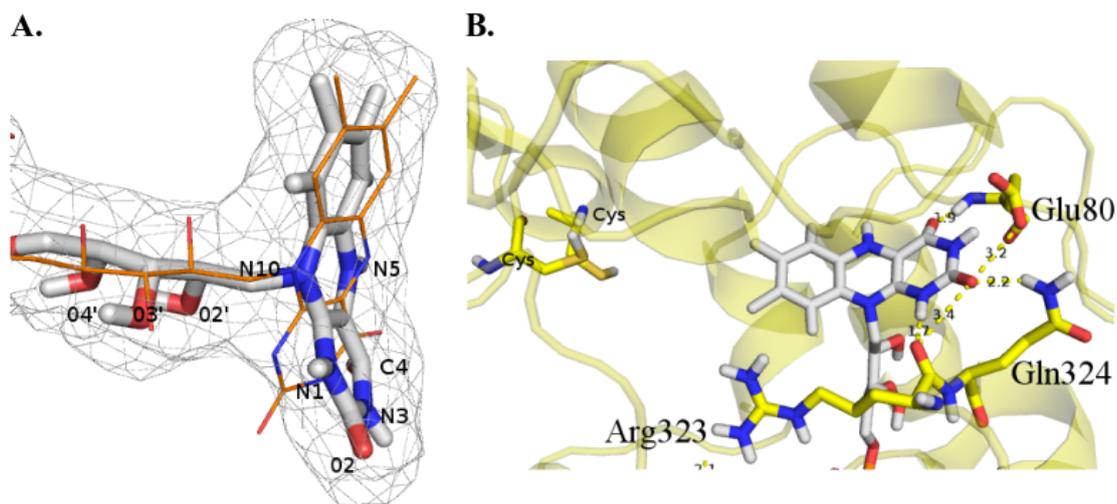


Figura 32. Exibição do anel de isaloxazina e parte da cadeia lateral ribitol do FAD em *CnTrr1*. (A) FAD da tioredoxina redutase na conformação oxidada (FO) em laranja em “lines”, e modelo de FAD na conformação reduzida (FR) derivado da DM em cinza, em “sticks”, identificando oxigênio em vermelho e nitrogênio em azul). (B) Interações do cofator FAD na *CnTrr1* na conformação FR. As ligações de hidrogênio afetadas pelas mudanças na conformação do FAD são mostradas com linhas tracejadas em amarelo.

3.2.19 Mudança conformacional do modelo reduzido (FR)

Enquanto nas Trr de eucariótos superiores e na glutathiona redutase (GR) o dissulfeto do sítio ativo é encontrado no domínio do FAD e a transferência de elétrons ocorrem sem qualquer mudança estrutural, nas Trr de baixo peso molecular o dissulfeto está localizado no domínio do NADPH e é inacessível à tioredoxina na conformação FO. Na chamada conformação reduzida FR o FAD está orientado para a redução pelo NADPH e as cisteínas reduzidas do sítio ativo são expostas para a tioredoxina (**Figura 33**).

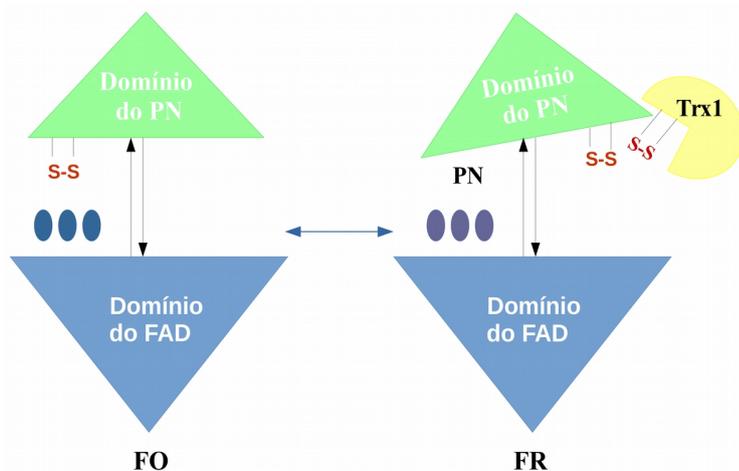


Figura 33. Representação esquemática de Trx na conformação FO e FR. Os domínios são indicados nos triângulos azul e verde e são conectados por linhas pretas que descrevem as folhas β . Os três círculos (azul escuro) representam o FAD e PN indica o nucleotídeo de piridina do NADP⁺. Fonte: adaptado de, Wang *et al.*, (1998). Embora a mudança conformacional é mostrada como uma rotação de 180° na ilustração, a rotação atualmente postulada é de 38° após verificar o ângulo de rotação no programa UCSF chimera.

Não existe um grande obstáculo estérico para evitar que essa rotação ocorra nas L-Trr, Waksman e cols., modelaram vários graus de rotação em torno do eixo de rotação e mostraram que o domínio de NADPH pode girar ao redor deste eixo sem criação de contatos proibitivos (Waksman *et al.*, 1994). A estrutura da *CnTrr1* mostra que o dissulfeto redox-ativo composto pelas cisteínas 170 e 173 é adjacente ao anel de isoaloxazina do FAD, e esta conformação favorece a transferência de elétrons entre a flavina e o dissulfeto (**Figura 34A**), sendo que o substrato da enzima parece ser incapaz de se aproximar ao ditiol da enzima enterrada nesta conformação (Waksman *et al.*, 1994). Na conformação reduzida, a localização do AADP gera uma interação entre o nucleotídeo de piridina e o FAD (**Figura 34B**). Segundo relatado, essa característica estrutural leva à proposta que mudanças conformacionais são requeridas durante a catálise da TrxR de *E. coli* (Lennon *et al.*, 1999).

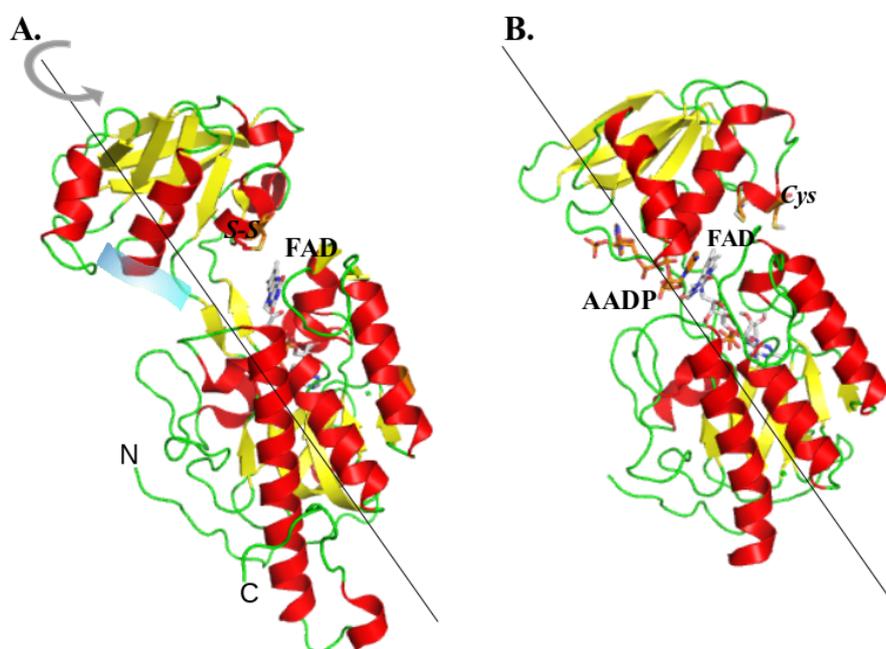


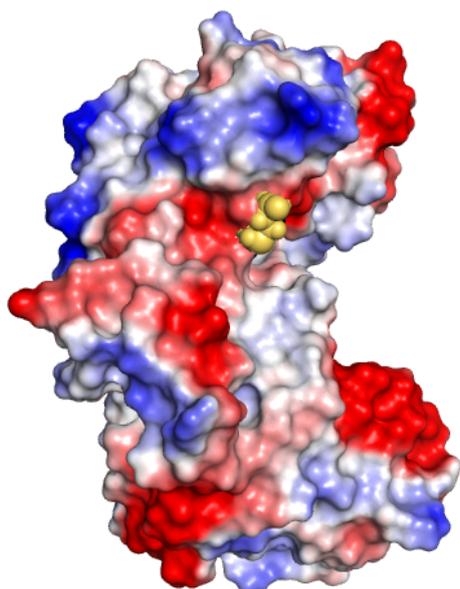
Figura 34. Conformação FO e FR da *CnTrr1*. Na conversão de FO (A) para FR (B), o domínio NADPH (que compreende os resíduos 151-276) rota $\sim 38^\circ$ em torno do eixo mostrado pela linha cinza. A conformação oxidada permite a reação do FAD reduzido com o dissulfeto do sítio ativo (S-S), em quanto que o NADPH se encontra longe para doar elétrons (retângulo- azul claro, possível posição), e em (B) a conformação FR permite a reação do nucleotídeo de piridina e o FAD, e posterior reação da Trx com as cisteínas do sítio ativo (Cys¹⁷³) da Trr.

3.2.20 Complexo Trr1-Trx1 de *C. neoformans* por docking

O modelo na conformação FR, complexado à Trx1 de *C. neoformans* (5JY5) é apresentado na **Figura 35**. O melhor modelo de interação entre as proteínas localizou as cisteínas do sítio ativo de

ambas estruturas adjacientemente, no que diz respeito à distância entre os resíduos do sítio ativo (Kozakov *et al.*, 2017).

A.



B.

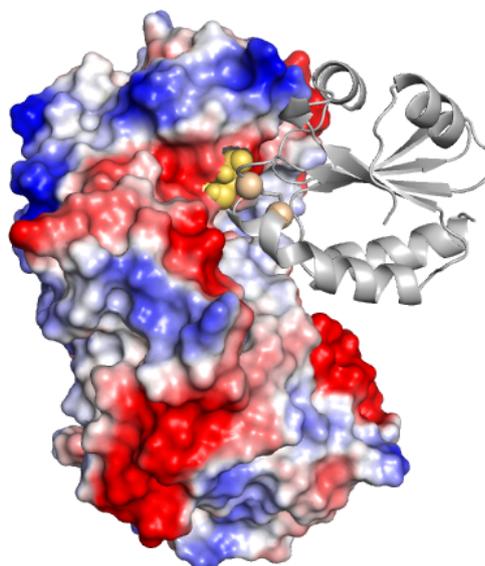


Figura 35. Superfície molecular de Trr1 FR e FR complexada a Trx1 (FRC). (A) Modelo estrutural da superfície molecular de *CnTrr1* no estado FR. Em azul e vermelho são representados os resíduos com cargas positivas e negativas, respectivamente. Em amarelo estão localizadas as cisteínas responsáveis pela transferência de equivalentes redutores para Trx1. (B) Interação de *CnTrr1* FR com a molécula *CnTrx1* (cinza). Para determinar o local de interação com o substrato foram utilizadas as coordenadas do complexo TrxR-Trx de *E. coli*.

O *docking* do complexo indicou a interação entre os resíduos Lys34_{Trx1}-Asp96_{Trr1}, Lys42_{Trx1}-Glu112_{Trr1} e Glu129_{Trr1}, Thr74_{Trx1}-Gln164_{Trr1}, Met72_{Trx1}-Asp174_{Trr1} e Lys70_{Trx1}-Ser165_{Trr1}, Gly248_{Trr1} e Glu249_{Trr1}, em *C. neoformans*. O modelo complexado sugeriu *loops* de *CnTrr1* em contato com a Trx1. No domínio de ligação ao FAD o *loop 1* que compreende os resíduos Thr¹²⁸-Met¹³⁸, o *loop 2* que compreende os resíduos Thr¹¹¹-Val¹¹⁴, e uma ligação de hidrogênio encontrada na hélice $\alpha 2$ (**Figura 36**).

Quando comparado com outras L-Trr, o *loop 1* é mais longo do que TrxR de *A. thaliana* e *E. coli*. Foi observado que vários resíduos desta inserção são carregados negativamente (TEGEEEEHEFM) e eles dão à *CnTrr1* uma superfície potencial mais negativa ao redor deste *loop* do que em TrxR em *E. coli* (Zhang *et al.*, 2009). Os resíduos do *loop 2* apresentam-se conservados em fungos e plantas, mas não em procariontes, sendo também identificado no modelo simulado Trr1-Trx2 em *S. cerevisiae*

(Zhang *et al.*, 2009). O *loop 1* e *2* foram encontrados por interagir com a Lys⁴² na hélice $\alpha 2$ de *CnTrx1*, rodeada por aminoácidos hidrofóbicos que expõem as suas cadeias laterais para as fitas β centrais. Em *ScTrx2* os resíduos Lys⁴³ e Lys⁹⁷ na hélice $\alpha 2$ e $\alpha 4$ foram sugeridos para estar envolvidos no reconhecimento proteína- proteína (Zhang *et al.*, 2009).

A Trx1 empacota-se contra os domínios do FAD e do NADPH da Trr1, porém, as interações com o domínio de NADPH parecem ser responsáveis pelo reconhecimento proteína-substrato (Lennon *et al.*, 2000). No domínio de ligação ao NADPH o *loop 3* que compreende os resíduos Trp¹⁶³-Gly¹⁶⁶, forma uma interação com Gln¹⁶⁴ da *CnTrr1* e a Thr⁷⁴ de *CnTrx1*. O *loop 4* compreendendo os resíduos Asp¹⁷⁴-Pro¹⁷⁸, forma uma interação com Asp¹⁷⁴ da *CnTrr1* e a Met⁷² de *CnTrx1*, sendo que o primeiro resíduo é altamente conservado em L-Trr e é o resíduo adjacente a Cys¹⁷³ do sítio ativo. E o *loop 5* compreendendo os resíduos Asp²⁴⁷-Val²⁵⁰. Em *CnTrx1* o *loop* Ala⁶⁷-Thr⁷⁵ ocupa o sulco complementar na superfície do domínio da *CnTrr1*. Na posição 70 desse *loop* é encontrada uma Lys apontando para a superfície e não para o sulco como relatado por Zhang *et al.*, (2009), formando interações polares com Ser¹⁶⁵, Gly²⁴⁸ e Glu²⁴⁹ da *CnTrr1*. Ao lado do sulco é encontrada a região AVPI (Ala¹⁷⁶, Val¹⁷⁷, Pro¹⁷⁸ e Ile¹⁷⁹), uma região hidrofóbica altamente conservada em L-Trr (**Figura 36**). Em TrxR de *E. coli*, nessa região são encontrados somente os resíduos Phe¹⁴¹ e Phe¹⁴² formando uma região hidrofóbica no bolsão hidrofóbico de *EcTrx1* (Lennon *et al.*, 2000).

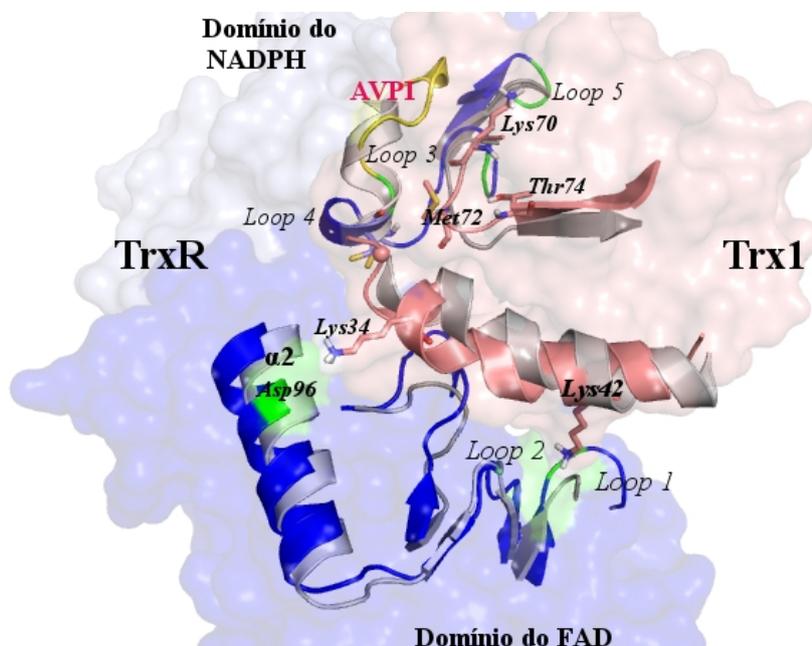


Figura 36. Modelo do complexo Trr1-Trx1 de *C. neoformans*. Usando a estrutura do complexo TrxR-Trx1 de *E. coli* (PDB: 1F6M) como molde, os domínios do NADPH (branco) e do FAD (azul) da *CnTrr1* são sobrepostos com a correspondente TrxR de *E. coli* (cinza). *CnTrx1* (rosa) é sobreposto com a Trx1 de *E. coli* (cinza). As

regiões ou *loops* que envolvem a interação proteína-substrato são identificadas em verde. Em amarelo é identificada a região AVPI conservada em Trrs de baixo peso molecular.

3.2.21 Simulação de *docking* com os ligantes

Docking das moléculas na conformação oxidada (FO)

O virtual *screening* tem como objetivo reduzir a grande quantidade de compostos disponíveis para um subconjunto de compostos focados a um alvo específico de maneira a tornar possível testar suas atividades individuais. Isto é alcançado principalmente pela filtração dos *hits* obtidos pelo *docking* que pré-seleciona candidatos hipotéticos com propriedades *drug-like* que possam se ligar à molécula alvo (Klebe, 2006). Neste trabalho, os compostos inicialmente pré-selecionados pela modelagem molecular e varredura virtual de quimiotecas, foram escolhidos por se ligar ao modelo do alvo *CnTrr1*. A região definida para busca foi o sítio da cavidade catalítica. Após verificar a atividade *in vitro* dos compostos pré-selecionados (19), os dois que apresentaram valores de CIM aceitáveis, foram ancorados desta vez na estrutura cristalográfica da *CnTrr1*.

Essas 2 moléculas do banco *Life Chemicals* são compostos orgânicos estruturalmente semelhantes, apresentando por exemplo, massa molecular variando de 413 a 589 Da. A maioria deles tem grupos comuns de carbonilo, sulfanilo e triazol e têm a capacidade de realizar interações, como ligação de hidrogênio e interação hidrofóbica, para formar um complexo com o alvo *Trr1* (Abadio *et al.*, 2015).

A partir da estrutura 3D de *Trr1* na conformação oxidada de *C. neoformas*, foi possível avaliar estes 2 compostos pré-selecionados como potenciais *hits*. A etapa de *docking*, realizada com o programa Autodock Vina, permitiu a busca de possíveis interações entre a proteína FO e os compostos, explorando os graus de liberdade conformacional do ligante. Os 2 compostos testados apresentaram resultados variados em ambos tipos de *docking*, sendo que quando o FAD é retirado da estrutura oxidada (apoproteína), as duas moléculas inibitórias ocupam a sua posição e se encaixam perto do sítio ativo, com melhores poses de afinidade do ponto de vista de estabilidade energética em relação ao sítio de ligação da proteína (**Tabela 9**). Quando o *docking* da proteína oxidada é feito com o FAD, as interações com os compostos apresentam afinidade mais baixa, sendo que os compostos são alocados em posições perto do sítio ativo.

Tabela 9. Afinidade de ligação das melhores poses dos compostos no *docking* rígido

<i>Small molecules</i>	Afinidade (kcal/mol)			
	Conformação FO, sem FAD		Conformação FO, com FAD	
Ligante	sítio	score	sítio	score
Mol_14	FAD (15)	-9.5	sítio ativo (20)	-8.9
Mol_3	FAD (18)	-9.8	sítio ativo(16)	-8.1
FAD	FAD (8)	-10.8	N.D	N.D

() número de poses neste sítio de um total de 20 selecionadas. N.D: não disponível.

As análises das interações que ocorrem entre a estrutura 3D de *CnTrr1* e as moléculas dos bancos de dados selecionados foram realizados com as conformações e coordenadas atômicas reais da estrutura. Isto possibilitou a confirmação da interação de resíduos do sítio ativo com as moléculas inibitórias selecionadas. A caracterização dessas interações sugere a especificidade destas moléculas desenhadas a partir de um modelo usando a estratégia de modelagem molecular por homologia.

O esquema de representações bidimensionais dos complexos proteína-ligante foram gerados pelo programa LIGPLOT (Wallace *et al.*, 1995), e a inspeção visual das estruturas foi feita para verificar as interações que ocorrem entre a *Trr1_{ox}* e as principais moléculas selecionadas. A molécula inibitória 14 interage na posição do FAD com os resíduos Leu⁷³, Gln⁷² e Gln³²⁴, sendo que os dois primeiros são envolvidos nas ligações de hidrogênio com o FAD. Enquanto que a molécula 3 realiza interações hidrofóbicas com resíduos de aminoácidos relevantes do sítio ativo da *Trr1* (**Figura 37**). A distância de interação polar entre os resíduos Gln⁷² e Leu⁷³ (N) e o O1 da molécula 3 foi de 3,1 e 2,8 Å, respectivamente. Os contatos hidrofóbicos de ambos os ligantes apresentaram proximidade com resíduos como Gly³⁹, Pro⁴⁰, Ala⁶⁴, Phe⁶⁷, Gly⁷¹, Gly¹⁴⁸, e Ala³²⁵.

Os complexos formados entre o alvo e os dois compostos (Mol_14 e Mol_3) mostraram que as moléculas se ligam preferencialmente perto das Cys¹⁷⁰ e Cys¹⁷³, na ausência do cofator (**Figura 38**).

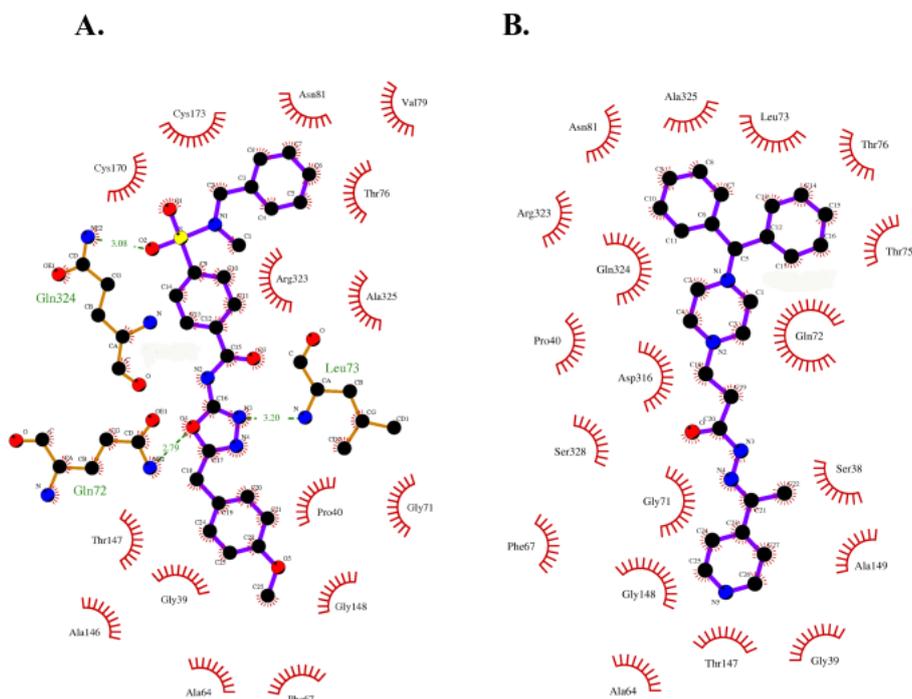


Figura 37. Interações entre a proteína Trr1_{ox} e as moléculas inibidoras. (A) Mol_14 (B) Mol_3, interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína.

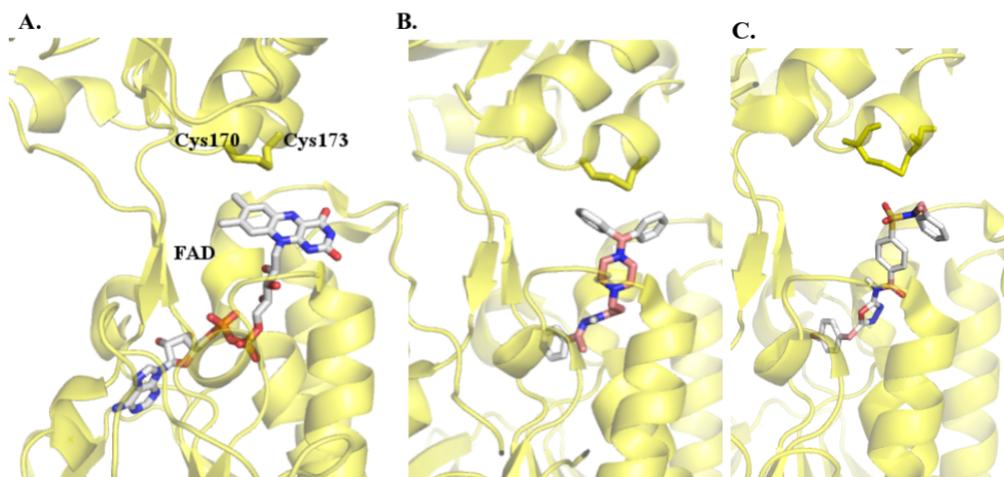


Figura 38. Docking, possível interação molecular de *C. neoformans* Trr1_{ox} com os ligantes. (A) Trr1_{ox} + FAD (B) Trr1_{ox} + Mol_3 e (C) Trr1_{ox} + Mol_14. Sítio do FAD sendo ocupado pelas moléculas.

Em relação ao *docking* à Trr1_{ox} ligada ao seu cofator FAD, os dois ligantes apresentaram ligações perto do sítio ativo. Assim quando observamos as interações dos ligantes na presença do cofator, a molécula 14 fez ligações de hidrogênio com a Ser¹⁹³ (no domínio do NADPH), Arg³²³ (no domínio do FAD), e com a Gly²⁷⁷ que faz parte do *loop* 274-277 que liga os dois domínios. As

interações hidrofóbicas nessa região ocorreram com a A169 e A275; enquanto que a molécula 3 fez só uma interação hidrofóbica com a V172 (**Figura 39**).

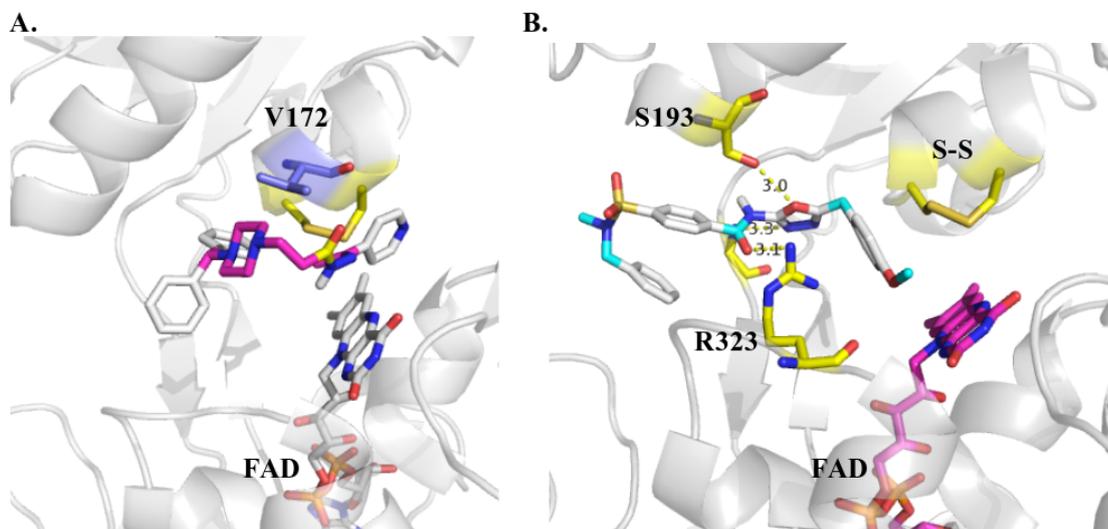


Figura 39. Docking - possível interação molecular dos ligantes com *C. neoformans* Trr1_{ox} complexada ao FAD. (A) Molécula 3, e a interação hidrofóbica com o resíduo Val¹⁷² (B) Molécula 14 e as interações polares com os resíduos Ser¹⁹³ e Arg³²³.

Docking das moléculas na conformação reduzida (FR)

O *docking* dos ligantes na conformação reduzida foi baseado no modelo_5 (FR) (descrito no item 3.2.18). Todos os experimentos de *docking* e dinâmica molecular analisados podem ser resumidos na **Tabela 10**. Os ligantes foram encontrados por interagir em varias regiões: no sítio do FAD, no sítio do NADPH próximos do sítio ativo, no sítio onde liga-se o substrato, e aleatoriamente. A tabela 10 foi agrupada em três partes de acordo com o modelo FR usado para o *docking*. 1. cinza: FR na presença e na ausência da molécula FAD. 2. rosa: FR sem FAD seguido pela simulação de dinâmica molecular, e 3. verde: FR ligado ao FAD seguido pela dinâmica molecular.

Tabela 10. *Score* das melhores poses dos compostos no *docking* e simulações de dinâmica molecular na conformação FR de Trr1.

Ligante	Modelo FR				DM do Modelo FR (APO)				DM do Modelo FR (HOLO)			
	sem FAD		com FAD		sem FAD		com FAD*		sem FAD		com FAD	
	Sítio	Score	Sítio	Score	Sítio	Score	Sítio	Score	Sítio	Score	Sítio	Score
14	FAD (2)	-10,4	NADP (14)	-9,6	Aleatório (11)	-6,8			ativo (4)	-11,2	Aleatório (5)	-8,1
	NADP (8)	-9,1					nd	nd				
	Trx (4)	-8,7	Trx (2)	-8,6	NADP (9)	-6,7			FAD (16)	-11,0	NADP (15)	-7,7
3	Trx (8)	-8,7	NADP (10)	-9,3					ativo (5)	-11,2		
	NADP (9)	-8,6	Trx (8)	-8,9	NADP (7)	-7,4	nd	nd	FAD (14)	-10,8	NADP (19)	-7,3
FAD					Aleatório (13)	-7,7						
	NADP (20)	-10,8	nd	nd	NADP (7)	-7,5	nd	nd	FAD (10)	-13,0	nd	nd

* sítio do FAD colapsou, quando a simulação de dinâmica (DM) foi realizada na proteína vazia. nd: não definido
-Em parêntesis são mostradas o número de poses possíveis, de um total de 20 para cada ligante. *Score*: (kcal/mol).

No primeiro grupo da tabela acima, foi possível caracterizar o comportamento das moléculas no sítio de ligação do modelo na conformação reduzida. O processo de *docking* com a molécula 14, mostrou que o ligante tem maior afinidade de ligação pelo sítio do FAD (-10,4 kcal/mol) e realizou ligações de hidrogênio com Ser³⁸ e Ser³²⁸, e interações hidrofóbicas com Ile³⁶, Pro⁴⁰, Ala⁴⁹, Ala⁶⁴, Phe⁶⁷, leu⁷³, Val¹¹⁴ e Ala³²⁵ (**Figura 40A**); observou-se que vários destes aminoácidos também participam das interações hidrofóbicas entre os ligantes e Trr na conformação FO. Isto provavelmente devido a que o domínio do FAD na conformação oxidada é o mesmo usado para modelar a conformação reduzida da Trr1, e que de acordo com a literatura não sofre mudança conformacional. Quando no *docking* desta molécula não está presente o FAD, o ligante apresenta afinidade por uma segunda pose apresentando interações com Ser¹⁹³ e His²⁷⁸ e compete pelo sítio que ocupa o NADPH interagindo hidrofóticamente com Leu⁷³, Val⁷⁹ e Ile²⁷⁶ (-9,1 kcal/mol) (**Figura 40B**). A menor afinidade do ligante se apresentou nos arredores do sítio onde o substrato se liga (-8,7 kcal/mol); duas ligações de hidrogênio intermoleculares

se apresentaram entre a Ala¹⁵¹ e Arg¹⁵³ e o ligante. Quando o *docking* ocorre em presença do FAD o ligante tem maior preferência pelo sítio que ocupa o NADPH (-9,6 kcal/mol), formando mais ligações de hidrogênio com Ser¹⁹³, Arg²¹⁸ e Arg³²³ e também hidrofóbicas com Ala²⁷⁵ e Ile²⁷⁶ (**Figura 40C**). Adicionalmente duas poses de menor pontuação sugeriram interações com Asn⁶⁵ (-8,6 kcal/mol), Ala¹⁵¹ e Arg¹⁵³ (-8,5 kcal/mol) que são resíduos de aminoácidos posicionados perto do sítio de ligação do substrato.

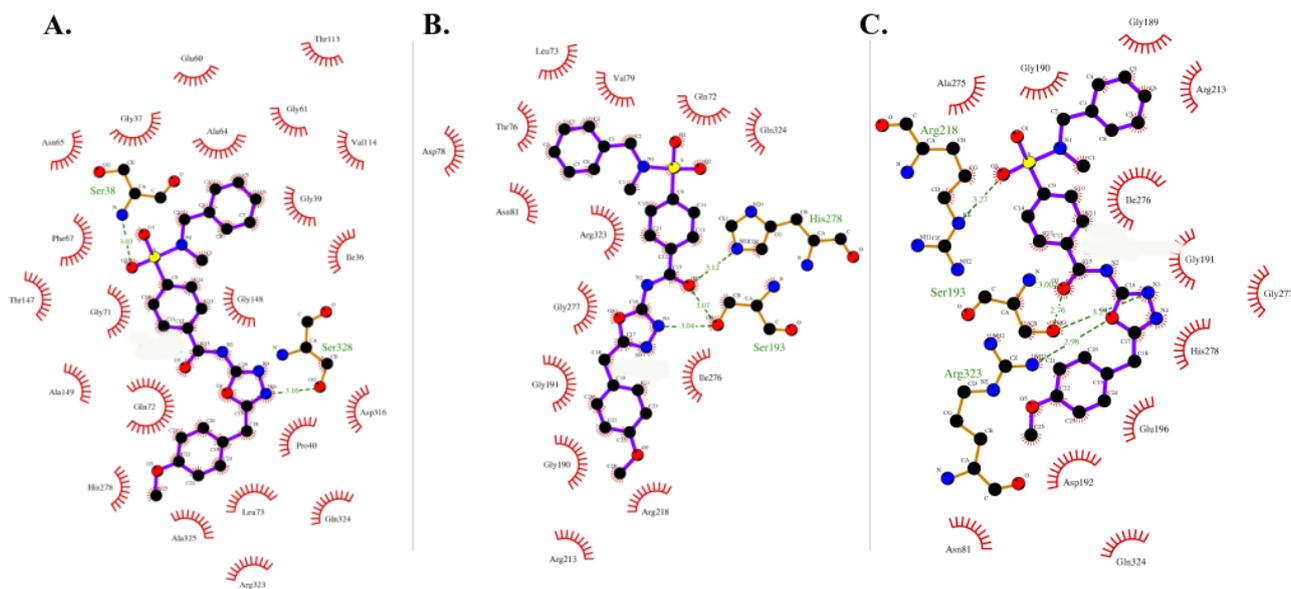


Figura 40. Interações entre o modelo reduzido (CnTrr1-FR) e a molécula inibitória 14.

Já para a molécula 3, quando o *docking* ocorre na ausência do FAD, o ligante tem afinidade pelas poses ao redor do sítio de ligação do substrato e parece interagir com Leu⁶³ e Asn⁶⁵ (**Figura 41A**), e eventualmente compete pelo sítio do NADPH na ausência (ligações de hidrogênio com Asp¹⁹², Ser¹⁹³, Arg³²³) e presença do cofator FAD (ligações de hidrogênio com Ser¹⁹³, Arg³²³); As interações hidrofóbicas desta molécula apresentaram proximidade com resíduos como Ala²⁷⁵, Ile²⁷⁶ e Leu¹⁵⁴ e com FAD (**Figura 41B**). Outra pose do ligante predita do *docking*, revelou que com o FAD incorporado na estrutura, a Mol_3 forma ligações de hidrogênio com os resíduos Leu⁶³ e Asn⁶⁵ localizados perto da posição onde interage a Trr com Trx (-8.9 kcal/mol).

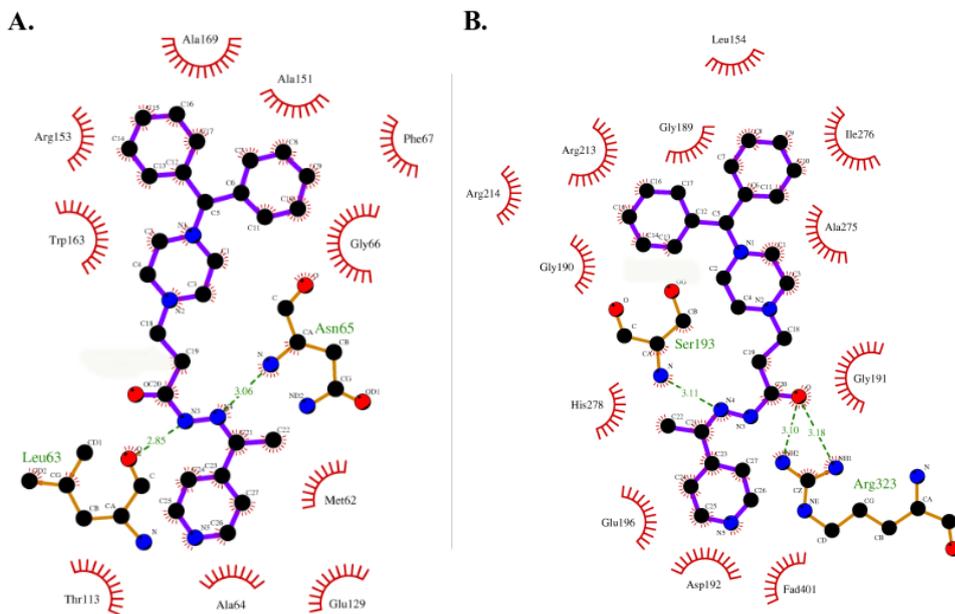


Figura 41. Interações entre o modelo reduzido (*CnTrr1* -FR) e a molécula inibitória 3.

No grupo 2 (rosa) foi observado que quando a dinâmica ocorre sem o FAD ligado à proteína, os valores de energia de ligação predita diminuem para cada conformação. Além disso, quando tentamos ligar a molécula de FAD no modelo FR após simulação de DM, observamos que a estrutura perde a possibilidade de ancorar o cofator, devido a um colapso nessa região, com compressão do bolsão do FAD. Sabe-se ainda, que o FAD participa das reações principais para oxidar e reduzir a enzima e, é conhecida a relação entre a sua presença e a dependência da atividade enzimática. Portanto, a utilidade do FAD para a correta integridade estrutural da enzima. A elevada afinidade desse (-13 kcal/mol) é resultado de suas ligações estabelecidas por intermédio de numerosas ligações de hidrogênio e interações de van der Waals. Assim, para garantir a preservação da estrutura de coordenação ao redor do FAD durante a simulação de DM, foram definidos os parâmetros de campo de força para o cofator.

Os resultados do grupo 3 (ciano) da holoproteína no modelo FR-após DM, mostram que na primeira análise de *docking* onde o cofator FAD é retirado da molécula, As moléculas 3 e 14 apresentaram uma pose com maior afinidade perto do sítio ativo (-11,2 kcal/mol) mas, o maior numero de poses ocupou o ambiente onde o FAD se liga, com valores de afinidade muito similares (-11,0 e -10,8 kcal/mol respectivamente) (**Figura 42A**). Na Figura 42A no *docking* com a Mol_14, sem o FAD, a molécula interagiu com o oxigênio da Ser¹⁹³, mas demonstrou interações principalmente hidrofóbicas nessa região com 11 resíduos: Pro⁴⁰, Phe⁶⁷, Leu⁷³, Val⁷⁹, Ala¹⁵¹, Ala¹⁶⁹, Tyr²⁷⁴, Ala²⁷⁵, Ile²⁷⁶ e Ala³²⁵. O resultado obtido evidencia que a molécula é localizada muito perto do sítio onde o FAD e NADPH

encontram-se para a transferência de elétrons (anel tricíclico isoaloxazina e nicotinamida do NADPH), e por isso os aminoácidos realizaram contatos muitos similares aos observados no modelo FR. Na **Figura 42B**, uma segunda pose teve afinidade pelo sítio que ocupa o FAD mas desta vez observou-se que o *N-benzyl-N-methylsulfamoyl* forma uma ligação de hidrogênio com o N-Glu⁸⁰ e O2-S.

Quando a Mol_3 foi ancorada na conformação FR- após DM, sem a presença do cofator, a ligação de hidrogênio ocorreu com a Thr⁷⁵, que é produto de uma ocupação intermediária entre os dois domínios perto do sítio ativo reduzido e que não foi observada no modelo da conformação FO ou FR. As interações hidrofóbicas apresentaram proximidade com a Leu⁷³, Val⁷⁹, Val¹⁷² (**Figura 42C**). A segunda pose do ligante na **Figura 42D** revelou a sua afinidade pelo sítio do FAD. Ao ocupar esse sítio, o ligante realizou ligações com a Ala¹⁴⁹ e realizou interações hidrofóbicas no *benzidriolo* com Pro⁴⁰ e Leu⁷³, e na piridina com Phe⁶⁷, Ala⁶⁸, Gly⁷¹ e Gly¹⁴⁸.

Quanto ao *docking* com a holoproteína na conformação FR- após DM e o cofator ocupando a sua posição, a Mol_14 teve maiores scores para a região aleatória, seguido pelo sítio do NADPH. Na **Figura 42E**, o ligante apresentou ligações de hidrogênio com Lys²⁹⁸ e Gly³⁰², e realizou interações hidrofóbicas (Ile²⁹⁷, Pro³⁰¹ e Ile³³⁴). Na **Figura 42F**, quando a região ocupada é a do NADPH, o ligante apresenta só interações hidrofóbicas do seu *oxadiazol* com a Leu²¹⁷ e Tyr²⁹⁶. A Mol_3, por sua vez, apresentou um padrão de afinidade maior pelo sítio que ocupa o NADPH. A piridina do ligante apresentou interações com a Arg²¹³, e realizou interações hidrofóbicas com Gly¹⁹⁰, Gly¹⁹¹, Ile²⁷⁶ e Gly²⁷⁷, e com o *benzidriolo* interagindo com a Tyr²⁹⁶ e a Tyr³²² (**Figura 42G**).

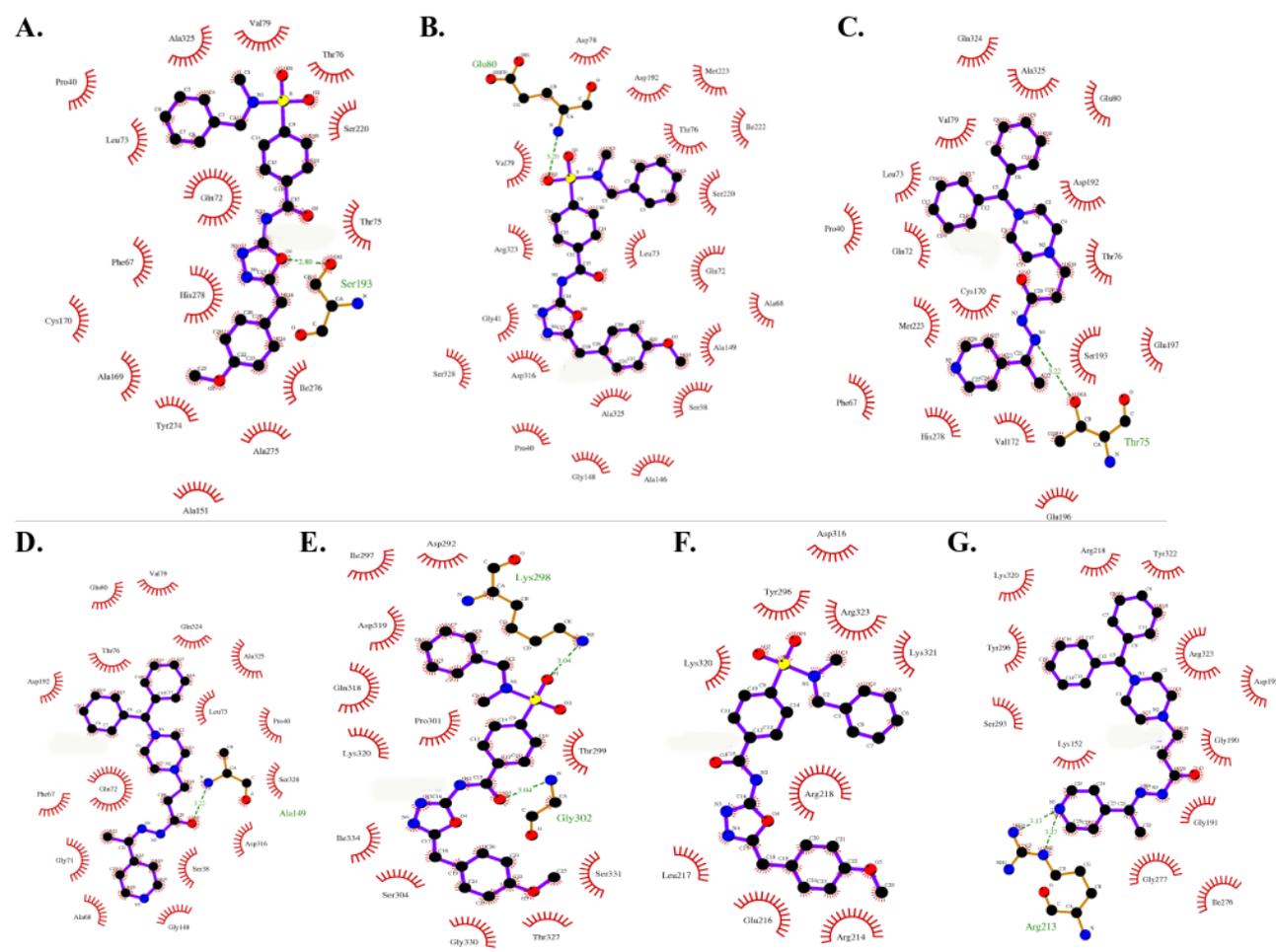


Figura 42. Interações entre a holoproteína (*CnTrr1*-FR após DM) e a molécula inibitória 14 (A, B, E e F) e 3 (C, D e G).

Curiosamente, as afinidades de ligação entre a holo-Trr1 reduzida (com FAD) e os ligantes, foram mais baixas do que a DM da holo-Trr1 reduzida sem o cofator, sendo encontradas no sítio que ocupa o NADPH. Os resultados sugerem a necessidade de uma parametrização do campo de força do cofator NADPH, uma vez que na ancoragem, esse é incapaz de ocupar o seu sítio correspondente na estrutura. Uma alternativa para superar essa dificuldade era à obtenção online de parâmetros de campo de força para essa molécula, no entanto, não foram compatíveis com o campo de força do software GROMACS.

A **Tabela 11** resume todos os resíduos de aminoácidos que apresentaram ligações hidrofílicas e hidrofóbicas no *docking* com os ligantes: na conformação FO, no modelo FR e no modelo FR após simulação de DM.

Tabela 11. Principais resíduos de aminoácidos que formam interações hidrofílicas e hidrofóbicas no docking com os ligantes e CnTrr1

	Trr1 Conformação FO				Modelo Trr1 Conformação FR				Dinâmica molecular do modelo Holo- Trr1 Conformação FR									
	- FAD		+ FAD		- FAD		+ FAD		- FAD		+ FAD		- FAD		+ FAD			
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B		
Sítio do FAD		perto- sítio do NAD+		Sítio do FAD/ *sítio- Trx		Sítio do NAD+		Sítio do NAD+		perto- sítio do NAD+		Sítio do FAD		Aleatório		Sítio do NAD+		
1 4	L73 Q72	G39 P40 A64 F67 G71 V79 A146 G148			S38 I36 P40 N65 A49 A64 F67 L73 * A151 R153 V114													
		C170 C173	S193	A169	A325	S193	G190 G191		G189 G190 G191		S193	A151 A169 C170	A146 G148 A149					
	Q324	A325	R323	A275		H278	I276 G277	A275 I276 G277	R323		Y274 A275 I276	I222 M223	L298 G302	I297 P301				L217 Y296
					S328						A325	A325			G330 I334			
3	-	G39 P40 A64 F67 G71 L73 G148 A149	-		* L63 N65	* A64 G66 F67			FAD									
		A325		V172		A151 M162 A169	D192	L154	L154	T75	L73 V79	A149	L73					G190 G191
							A275 I276 G189	G189 G190 G191	S193		C170 V172 C173	G148					R213	I276 G277
						R323	R323	R323	R323		M223							Y296
										A325								Y322

A= Ligação hidrofílica, B= Ligação hidrofóbica, *sítio-Trx,
(- FAD): na ausência do cofator. (+ FAD): na presença do cofator.

Recentemente, Abadio e cols., avaliaram a Trr1 de *Paracoccidioides* spp como um novo alvo para drogas. Os estudos de modelagem molecular em combinação com a varredura virtual identificaram 3 potenciais compostos inibidores da tioredoxina redutase. As CIM foram 8µg/mL, 16 µg/mL, e 32 µg/mL. Além disso, resultados de *docking* usando o modelo Trr1 de *P. lutzii* sugeriram que os compostos realizam interações hidrofóbicas com aminoácidos relevantes do sítio ativo (Abadio *et al.*, 2015). Interessantemente, outros grupos também têm mostrado que o sistema Trx é um novo alvo para drogas. Uma classe de antibióticos de pirazolona foram mostrados por ser potentes inibidores de *S. aureus* e *M. tuberculosis*, inibindo a proteína TrxR destas bactérias (CIM₉₀ 8 µg/mL para *S. aureus*). Os compostos ancorados nos modelos reduzidos a partir das estruturas cristalográficas (conformação FO) mostraram que o composto *lead* 5376 prevê interações com diferentes resíduos que participam em interações iônicas. As interações moleculares ocuparam a posição do sítio do NADPH. O modelo molecular de *M. tuberculosis* (2A87) revelou que o composto ancorado forma uma ligação iônica com a Arg¹⁸⁶, Arg¹²⁷ e Arg²⁹², enquanto o Asp²⁶⁶ atuou como um doador na cadeia lateral. Na estrutura cristal de *S. aureus* (4GCM), a Arg¹⁷⁵ e Arg¹⁸⁰ -duas argininas carregadas positivamente- participaram das interações iônicas (Sweeney *et al.*, 2017). Curiosamente a Arg¹⁸⁶ é equivalente à Arg²¹³ em Trr1 de *C. neoformans*, onde a Mol_3 ocupando a região do NADPH fez interações polares com o grupo guanidina deste aminoácido na holoproteína (FR) obtida da dinâmica.

Outro estudo feito com a varredura virtual, identificou pequenas moléculas inibitórias da TrxR de *M. tuberculosis* (*MtTrxR*) que visam a interação do sítio proteína- proteína com o substrato Trx. O modelo de *MtTrxR* foi criado usando como molde o PDB 1F6M (complexo TrxR-Trx), que imitou a conformação FR removendo apenas o domínio do FAD. O estudo sugeriu que para os compostos sintetizados em base à 4-(piperidin-1-il) anilina, as melhores poses são localizadas dentro da fenda hidrofóbica de ligação à tioredoxina, perto das cisteínas do sítio ativo (Cys¹⁴⁸), por interações de ligação de hidrogênio com Asp¹⁴⁹ e Thr²⁴² (Koch *et al.*, 2013). Em *CnTrr1* esses resíduos correspondem à Cys¹⁷⁰, Asp¹⁷⁴, e a Thr é substituída por Asn²⁷⁰, respectivamente. Como relatado no modelo *CnTrr1*-Trx1, o resíduo Asp¹⁷⁴ mostra-se como um aminoácido importante no complexo de interação com a *CnTrx1* (Met72), no entanto nenhum dos resíduos identificados no *docking* que ocupam regiões próximas à ligação da *CnTrx1*, esteve associado com os resíduos encontrados do modelo complexado. As poses perto das cisteínas do sítio ativo no modelo reduzido envolvem os resíduos: Leu⁶³, Asn⁶⁵, Ala¹⁵¹ e Arg¹⁵³. Já no modelo reduzido após simulação de DM (holo-modelo FR) sem a presença do cofator, a Mol_3 apresentou ligações de hidrogênio com a Thr⁷⁵ e varias interações hidrofóbicas com aminoácidos próximos do sítio catalítico e com a Cys¹⁷⁰. Na conformação FO da *CnTrr1*, foi possível

observar que a Gln⁷² e Leu⁷³ são resíduos que formaram ligações de hidrogênio no *docking* com a Mol_14 ao redor das cisteínas do sítio ativo.

Finalmente a maioria das poses de *docking* obtidas da Trr1_{ox}, do modelo FR e das simulações de DM com os 2 potenciais inibidores, mostram que os resíduos S193 e R323 aparecem com maior frequência formando ligações de hidrogênio em ambos os ligantes, considerados na análise pela preferência do sítio que ocupa o NADPH.

Tendo em vista que o mecanismo de ação da CnTrr1 envolve a associação da enzima ao seu substrato, foram realizadas novas simulações de DM da holoproteína na conformação FR. Para isso, foi ampliado o tamanho da caixa de simulação (center_x = 50, center_y = 40, center_z = 40) para que fosse o suficientemente grande para abranger a posição da CnTrx1 na conformação reduzida.

O docking molecular do modelo FR com a Mol_14, revelou que das 20 simulações as melhores posições da interação entre a molécula e a proteína são encontradas no sítio que ocupa o NADPH (-10,4 kcal/mol). No entanto, pontuações do *score* de -9,2 kcal/mol foram visualizadas na interação do ligante pelo possível sítio que ocupa o substrato. O ligante apresentou três ligações hidrogênio com Asn⁶⁵ (N), Ala¹⁵¹ (N) e Arg¹⁵³ (N) (**Figura 43A**), além de contatos hidrofóbicos com resíduos: Ala¹⁶⁹, Gly⁶⁶ e Phe⁶⁷. Com a holoproteína FR submetida à simulação de DM duas poses principais foram observadas, uma aleatória com uma afinidade de ligação de -8,1kcal/mol (como mostrado na **Tabela 10**), e uma segunda pose com preferência pela cavidade que ocuparia a CnTrx1, com tudo o *docking* apresentou mais baixos *scores* (-7,6 kcal/mol), se referendo a afinidades de ligação menores. Os resultados provenientes da DM mostraram que os principais resíduos que interagem por ligações de hidrogênio com a molécula 14 são: Ala⁶⁸, Arg⁹⁹ His²⁷⁸ (**Figura 43B**). As interações hidrofóbicas nessa região não foram muito alteradas envolvendo novamente os resíduos: Ala¹⁶⁹, Gly⁶⁶, Phe⁶⁷, e adicionalmente Pro⁶⁹, Gly⁷⁰ e Ala¹⁵¹.

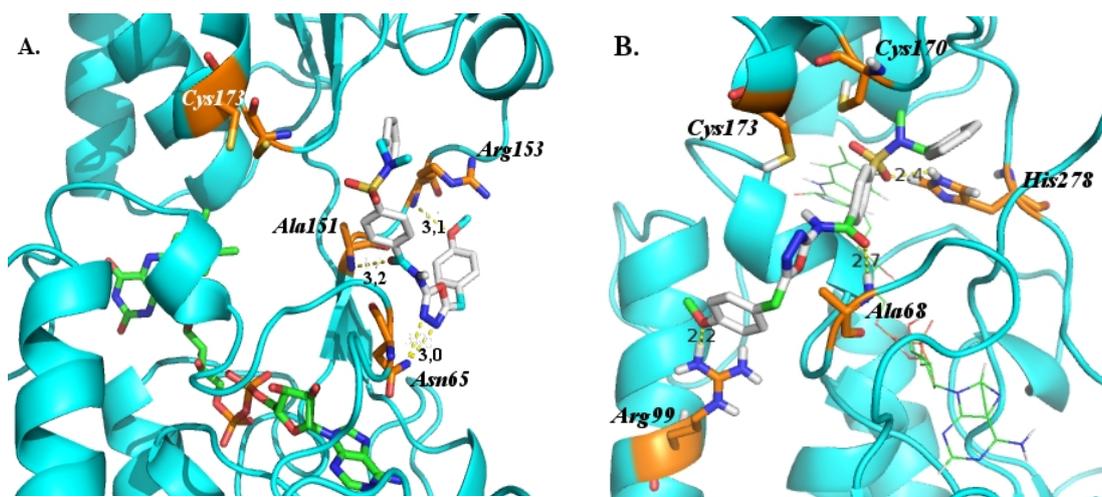


Figura 43. Interações polares pontilhadas em amarelo e a distância em Å com a molécula 14. (A) Na holoproteína na conformação FR (ciano) com os resíduos R153, A151 e N65, e **(B)** Na holoproteína na conformação FR da DM (ciano) com os resíduos H278, R99 e A68 ao ocupar o sítio do substrato.

O docking molecular do modelo FR com a Mol_3, revelou que o ligante apresenta um conjunto de possibilidades de ligações de hidrogênio no *Loop* Tyr⁵⁹-Gln⁷² com os resíduos Leu⁶³ (O) e Asn⁶⁵ (N) (**Figura 44A**), e de modo hidrofóbico com Ala⁶⁴, Gly⁶⁶, Phe⁶⁷, Ala¹⁵¹ e Ala¹⁶⁹. A seleção da pose no lugar que ocupa o substrato foi acompanhada pela afinidade de ligação de -8,9 kcal/mol, embora a melhor pose do ligante se apresentou quando esse ocupa o sítio que ocupa o NADPH com um *scoring* de afinidade de -9,3 kcal/mol. Com a holoproteína FR submetida à simulação de dinâmica molecular, a molécula teve a sua melhor afinidade de ligação pelo sítio de complexação do substrato (-8,1 kcal/mol), com 13 das 20 possíveis posições ocupando essa região. A outras 7 poses com uma menor afinidade de ligação foram observadas quando o ligante ocupa a posição do NADPH. As ligações de hidrogênio envolvidas na pose preferencial do ligante são geradas pelos resíduos: Ala⁶⁸ (H) e Ser¹⁹³ (HO) com o oxigênio e o N6 da piridina do ligante, respectivamente (**Figura 44B**).

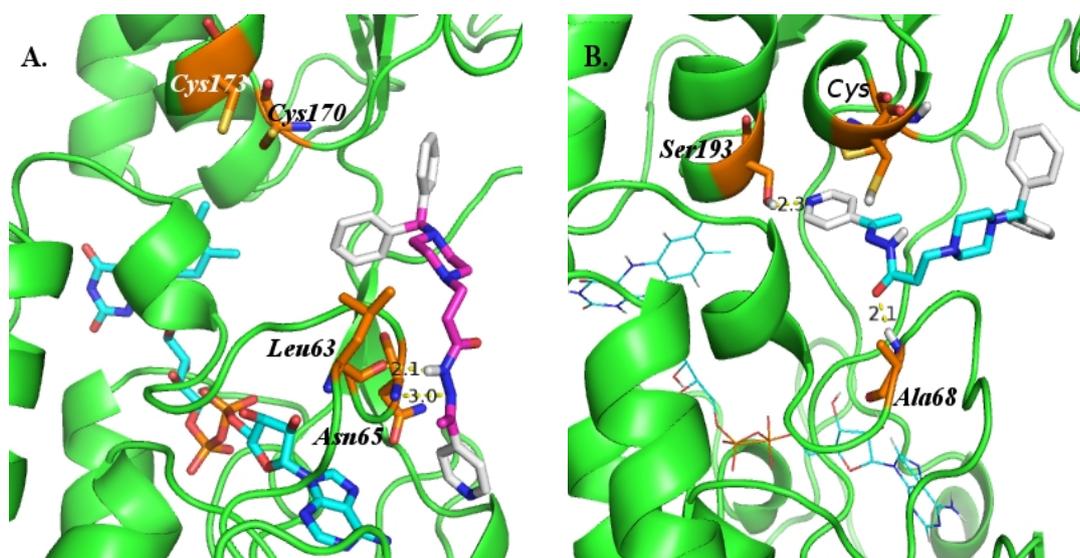


Figura 44. Interações polares pontilhadas em amarelo e a distância em Å com a molécula 3. (A) Na holoproteína na conformação FR (verde) com os resíduos N65 e L63, **(B)** Na holoproteína na conformação FR da DM (verde) com os resíduos A68 e S193 ao ocupar o sítio do substrato.

Embora, nos dois tipos de docking realizados (Modelo FR e modelo FR submetido à simulação de DM) as ligações de hidrogênio foram diversas, as ligações hidrofóbicas se mantiveram constantes entre os resíduos de aminoácidos dessa região, indicando que os ligantes mantêm afinidade por esse bolso localizado entre os *loops* Glu⁶⁰-Gln⁷², Ala¹⁵¹-Pro¹⁵⁷ e Tyr¹⁶²-Ala¹⁷¹ na proteína na conformação reduzida.

Em *S. cerevisiae* o *loop* Glu³³-Gly⁴³ da Trr1 parece estar envolvido na interação com Trx2 do mesmo fungo (Zhang *et al.*, 2009), embora o complexo do modelo *Cn*Trr1-Trx1 não encontrou nenhuma ligação hidrofílica nesse *loop* (Glu⁶⁰-Gly⁷⁰) e sim, várias interações hidrofóbicas na hélice α 2 (Glu⁶⁰-Ala⁶⁸, em *Cn*), foi observado que a Mol_3, teve certa preferência pelos resíduos ao redor deste *loop* (ligações hidrofílicas com a Leu⁶³ e Asn⁶⁵). Da mesma forma a Mol_14 apresentou ligações de hidrogênio com o resíduo Ala⁶⁸ também envolvido nesse *loop* de complexação. Isso, poderia indicar uma possível pré-seleção do espaço químico para um composto que visa a fenda de ligação à Trx que é exclusiva nas Trr fúngicas pelos resíduos extras conservados nessa posição. Já que os valores de CIM ainda não são suficientemente baixos, estes compostos podem ser usados como promissores *hit-to lead* após otimização. Nossos resultados indicam que as moléculas formam ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas que ocorrem perto do sítio ativo da enzima, que justifica o sucesso destas ao se ligar no espaço químico conservado.

4. CONCLUSÕES CAPÍTULO I

- As proteínas recombinantes Trr1 e Trx1 de *C. neoformans*, foram produzidas em forma solúvel e foram purificadas com sucesso mediante o uso de cromatografia por afinidade e cromatografia de exclusão molecular. *CnTrx1* se apresentou como um monômero em solução, enquanto a enzima *CnTrr1* se apresentou como um dímero.
- As proteínas recombinantes foram cristalizadas e a estrutura 3D das proteínas *CnTrx1* e *CnTrr1* foi determinada por cristalografia de raios X, na resolução de 1,80 Å e 2,25 Å, respectivamente.
- A estrutura terciária de *CnTrx1* revelou pequenas diferenças com Trxs oxidadas e reduzidas de outras espécies, mantendo o enovelamento típico de Trx. A Trx1 apresentou um dobramento característico típico contendo o motivo do sítio ativo conservado (Cys-Gly-Pro-Cys). O resíduo de triptofano (Trp) tem uma função estrutural no sítio ativo e no bolso hidrofóbico ao redor dessa região.
- *CnTrr1* apresenta maiores mudanças conformacionais na estrutura secundária e terciária nos pHs 4,0 e 5,0.
- A estrutura 3D de *CnTrr1* apresenta um *loop* extra na região N- e C-terminal. A distância de 2,04 Å entre os dois resíduos de Cys (170-173) revelou que *CnTrr1* encontra-se na conformação oxidada (FO).
- A estrutura da proteína *CnTrr1* na conformação reduzida (FR) foi predita por modelagem molecular por homologia usando as coordenadas atômicas da proteína oxidada (5w4c) e as coordenadas de *E. coli* TrxR-Trx (1F6M).
- O modelo na conformação FR após simulação de DM, foi usado para ancorar a Trx1 de *C. neoformans* (5JY5). O modelo complexado em relação com as regiões com potencial de ligação a Trx1 sugeriram pequenas diferenças quando comparado com o modelo simulado em *S. cerevisiae*.
- O docking das moléculas inibitórias (3 e 14) identificadas pela varredura virtual, na *CnTrr1* oxidada, no modelo reduzido e no modelo FR após simulação de DM, mostrou preferência pelo sítio ativo da enzima e pelas regiões ao redor deste sítio.



CAPÍTULO II

**Estudos *in vitro* e *in vivo* das moléculas potencialmente
inibidoras do fungo patogênico**

C. neoformans

1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a suscetibilidade das cepas de *C. neoformans* aos potenciais inibidores identificados pela varredura virtual e validar a sua inibição na enzima *CnTrr1*.

1.1 Objetivos específicos

- a) Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das moléculas sobre cepas de *C. neoformans*
- b) Análise *in vitro* da inibição da enzima *CnTrr1* por moléculas potencialmente inibidoras.
- c) Validação das moléculas inibidoras (identificadas nos testes *in vitro*) em modelo murino *in vivo* de infecção animal pelo patógeno *C. neoformans*.
- d) Realizar a imunolocalização da proteína *Trr1* em *C. neoformans*.

2. POTENCIAL ANTIFÚNGICO DAS MOLÉCULAS INIBITÓRIAS

Vários critérios devem cumprir os alvos potenciais para a ação de antifúngicos. Um alvo potencial deve ser essencial para a sobrevivência das células fúngicas, seja no processo de crescimento, estabilidade homeostática ou infecção do hospedeiro. Também é importante que o alvo seja uma proteína fungo-específica, conservada, no entanto, a afinidade com outras drogas deve ser baixa. As vias metabólicas fungo-específicas são alvos atraentes porque cada componente metabólico é um alvo potencial. Por último, uma vez que a membrana plasmática pode atuar como uma barreira para produtos químicos, as proteínas da superfície celular são alvos preferíveis (Agarwal *et al.*, 2008).

Com base em todas essas informações até aqui apresentadas sobre a importância da geração de novos compostos antifúngicos, o **capítulo II** descreve os estudos *in vitro* e *in vivo*, que determinaram o potencial de inibição dos compostos selecionados por varredura virtual de quimiotecas, sob o crescimento do fungo *C. neoformans*. Esses compostos apresentaram características que as descrevem como potenciais drogas que tem como alvo a enzima tioredoxina redutase. Sendo assim, das 19 moléculas testadas *in vitro*, 2 apresentaram atividade antifúngica contra o fungo patogênico. Nos ensaios de caracterização enzimática *in vitro*, essas 2 moléculas também foram capazes de inibirem a enzima Trr1, utilizando a tioredoxina do mesmo fungo como substrato. Adicionalmente, os resultados revelaram que os compostos têm atividade *in vitro* útil, potencialmente com baixa toxicidade quando foram testadas contra células de mamíferos *in vitro*. A pesquisa realizada *in vitro* quanto à efetividade das moléculas inibitórias contra *C. neoformans* apontou para a necessidade de estudos adicionais em modelo animal para confirmar o potencial destas moléculas no tratamento da criptococose. Os estudos em modelo animal são cruciais, já que esses modelos são caminhos obrigatórios no trajeto de estudos *in vitro* até os procedimentos clínicos (Graybill 2000). Embora, as moléculas (mol 3 e mol 14) não apresentaram eficácia na redução das UFCs dos órgãos dos animais, portanto, insuficientes para controlarem a infecção, esse resultado pode ser atribuído à metodologia do tratamento empregado, apesar de que não se descarta o fato de que a molécula não foi absorvida corretamente.

“Milhares de compostos são abandonados ao longo caminho decorrido desde a concepção de uma nova molécula até sua comercialização, em grande parte devido à farmacocinética inadequada” (Pereira, 2007). Assim, a otimização destas moléculas frente ao seu alvo Trr1, é muito importante para a seleção de compostos mais promissores. O desafio é traçar modificações moleculares que gerem compostos com propriedades aceitáveis e sobretudo com eficácia terapêutica para o seu uso clínico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ensaios de atividade antifúngica *in vitro*

Após a obtenção das moléculas selecionadas, foram iniciados os testes de validação destes compostos como possíveis antifúngicos importantes no tratamento fúngico. Os primeiros ensaios foram testes *in vitro* para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) baseada na técnica de microdiluição em caldo seguindo as normas de padronização preconizadas pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), publicadas no documento M-27A4. (NCCLS, 2008).

3.1.1 Inóculo

As leveduras foram crescidas por 48 h em meio líquido YPD (extrato de levedura 1%, glicose 2%, bacto-peptona 2% pH 7.2) a 30 °C. Os inóculos da cepa H99 e de 5 isolados clínicos foram lavados 2x em tampão salina estéril (0.9%). Uma suspensão de leveduras foi preparada em 1 mL de salina e ajustada em uma densidade de $1-5 \times 10^6$ células/mL através de contagem em câmara de Neubauer. Esta suspensão foi diluída 1:50 em água destilada e a seguir, 1:20 em meio RPMI 1640 para se obter a densidade de células desejada. As células e as soluções contendo as moléculas foram diluídas 1:1, para uma concentração final de 2×10^3 células/mL.

3.1.2 Agentes antifúngicos e procedimento do teste

O fluconazol foi dissolvido em água, enquanto que a anfotericina B foi dissolvida em dimetilsulfóxido. Destes foram preparadas soluções padrão de 3000 µg/mL. Foram geradas as soluções de trabalho 1 (ST1): 640 µg/mL para o Fluconazol e 160 µg/mL para a anfo B e a solução de trabalho 2, diluída 1:5 em RPMI da ST1, de tal modo que as concentrações variaram de 0,125 a 64 µg/mL para fluconazol, e 0,0313 a 16 µg/mL para anfotericina B. O dimetilsulfóxido foi também usado como diluente para as 19 moléculas (concentração estoque 4 mg mL⁻¹). As concentrações das 19 moléculas selecionadas variaram de 0,125-64 µg/mL.

Os compostos foram diluídos em meio RPMI [RPMI-1640 sem bicarbonato, com L-glutamina, suplementado com 2% de glicose e tamponado (pH 7) com 0,165 M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma-Aldrich)]. Os fungos foram incubados na ausência e presença de DMSO 0,5% (vol/vol) para confirmar que a exposição a esse solvente não influencia no crescimento das cepas testadas. A cada poço, contendo 100 µL do agente antifúngico, foram adicionadas alíquotas de 100 uL do inóculo, de modo que as concentrações das moléculas e fármacos ficaram

diluídas 2x. Em cada placa foram feitos os controles, inóculo e meio de cultura (RPMI) e inóculo e meio de cultura em DMSO.

3.1.3 Incubação e leitura

O teste foi realizado em microplacas estéreis (TTP Zellkultur Test Plate 96F, suíça) contendo 96 poços. A cepa de *C. neoformans* (H99) foi utilizada como levedura referência para todos os testes. O tempo de incubação conforme o fungo testado foi de 48 h a 37 °C. Os dados foram apresentados para MIC₉₀ que correspondem à concentração mínima inibitória capaz de inibir 90% do crescimento dos isolados. Subculturas de todos os poços que apresentaram inibição do crescimento foram plaqueados em meio BHI. Para leitura dos resultados foi verificado o crescimento da levedura, através da observação da turbidez do meio, comparado ao controle de crescimento (livre de antifúngico). A leitura das absorbâncias foi realizada à 595 nm, 2 dias depois da incubação com as moléculas e antifúngicos, em um espectrofotômetro de microplacas (Spectra Max, Molecular Devices). Adicionalmente foi avaliada a possível atividade fungicida (CFM). Para isso alíquotas dos testes das diluições foram transferidas para placas contendo meio sólido de cultura completo, isento de drogas antifúngicas a fim de avaliar se a atividade inibitória é também fungicida. A representação esquemática do teste de suscetibilidade *in vitro* para fungos é mostrada na **Figura 45**. Todas as determinações de CIM e CFM (concentração fungicida mínima) foram feitas em triplicata.

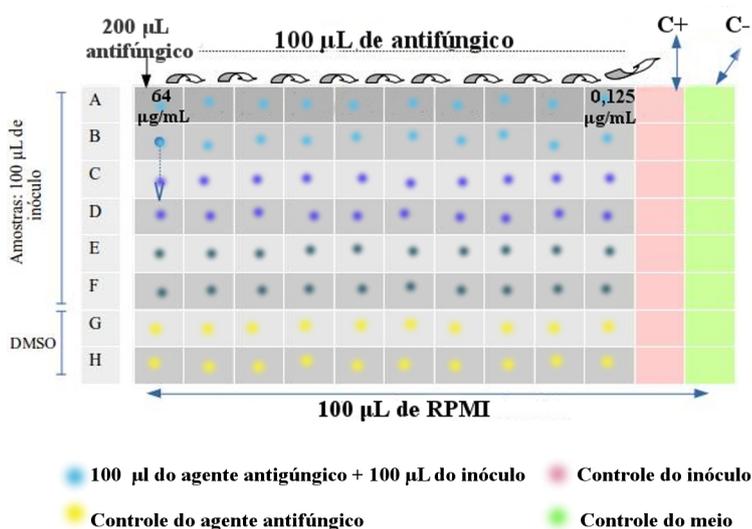


Figura 45. Representação esquemática da realização do teste de suscetibilidade *in vitro* pelo método de microdiluição em caldo.

3.2 Curvas de crescimento

As leveduras foram contadas em câmara de Neubauer e a densidade foi ajustada para $2,5 \times 10^3$ células/mL em meio RPMI. As células foram cultivadas na presença das diferentes concentrações das

moléculas 14 e 3 (64, 32, 16 e 8 µg/mL), anfotericina B (16, 8 e 4 µg/mL) e fluconazol (4, 2 e 1 µg/mL) a 37 °C. Como controle, as células foram crescidas sem adição das moléculas, ou adicionando DMSO a uma concentração máxima de 0,5% (controle de crescimento do fungo). As medidas de absorbância (595 nm) foram obtidas com o uso de leitor de microplaca (BioTek EON™), após 4 dias de incubação. Para o ensaio de unidade formadora de colônia (UFC), as leveduras foram crescidas na presença das drogas por >100 h, sendo realizadas as coletas do inóculo no último dia de incubação. Para análise quantitativa foi realizada uma diluição 1:10. 50 µL foram plaqueados em ágar YPD (no volume de 25 µL) por 48 h de incubação a 37 °C. Adicionalmente, as células que foram incubadas até 110 h (na presença e ausência das moléculas), foram examinadas por microscopia óptica para observar possíveis alterações morfológicas. A percentagem de alterações morfológicas em relação ao número total de células foi calculada para pelo menos 100 células. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3 Ensaio enzimático

Os estudos cinéticos foram realizados com a enzima tioredoxina redutase (Trr1) recombinante de *C. neoformans*. Como substrato, foi utilizada a tioredoxina (Trx1) recombinante do mesmo fungo. Para a determinação dos parâmetros cinéticos, os ensaios de atividade da enzima foram realizados através de um ensaio colorimétrico que monitora sua atividade sobre os substratos, a Trx1 e o NADPH. O ensaio baseia-se na redução do ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) gerando o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), que produz uma coloração amarela medida a $A_{412\text{ nm}}$ (Arnér e Holmgren, 2000). As atividades específicas foram determinadas usando o coeficiente de extinção molar de TNB liberado durante a reação ($13,600\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

O experimento foi realizado a 25 °C em espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu). A reação foi iniciada pela adição da Trr1 a 0,09 µM, o substrato Trx1 em concentrações variadas de 0,25 a 15 µM e NADPH 0,2 mM a uma solução contendo tampão de fosfato de potássio 100 mM pH 7,0; DTNB 3,0 mM, BSA 0,1 mg/mL e EDTA 1,0 mM para um volume final de 1 mL. O aumento da $A_{412\text{ nm}}$ foi monitorado nos 300 sec iniciais. Os parâmetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ e K_m foram determinados a partir da equação de Michaelis-Menten (Equação 8), traçando o gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk (inverso da velocidade inicial x inverso da concentração do substrato) e usando o programa GraphPad Prism. Três experimentos independentes foram realizados para cada concentração de Trx1.

$$V = V_{m\acute{a}x} [S] / K_m + [S] \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde S é a concentração de substrato em μM , V_0 é a velocidade de reação inicial em $(\mu\text{M}\cdot\text{s})^{-1}$, $V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade de reação máxima em $(\mu\text{M}\cdot\text{s})^{-1}$, e K_m é a constante de Michaelis-Menten ou a concentração de substrato para qual a enzima atinge a metade de $V_{m\acute{a}x}$ μM .

O k_{cat} em s^{-1} , número de renovação (*turnover number*) foi calculado como:

$$k_{cat} = V_{m\acute{a}x} / [E_i] \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde $[E_i]$ é a concentração de enzima inicial em μM . E a eficiência catalítica (EC) em $(\mu\text{M}\cdot\text{s})^{-1}$ foi calculada de acordo com a Eq. 10:

$$EC = k_{cat} / K_m \quad (\text{Eq. 10})$$

3.3.1 Inibição enzimática da *CnTrr1* com os potenciais compostos antifúngicos

Para confirmar se os compostos selecionados *in vitro* foram capazes de inibir especificamente a enzima recombinante de *C. neoformans*, o ensaio de inibição foi realizado em presença e ausência dos inibidores. O ensaio de atividade da tioredoxina redutase foi realizado como descrito acima. Para a adição do substrato (*CnTrx1*) foram selecionadas 5 concentrações 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 6,0 μM para a molécula 14 e 3 concentrações 1,0; 4,0 e 14,0 μM para a molécula 3. Na presença de inibidor as moléculas foram adicionadas nas concentrações de 32 (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CIM), 65, 130 e 260 μM para a molécula 14, 36, 72,5, 145 (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CIM) e 290 μM para a molécula 3. Os valores de IC_{50} (concentração do inibidor que exibe a metade do efeito inibitório máximo) para um determinado inibidor competitivo e misto, foram calculados usando a equação de Cheng-Prusoff, (1973) Eq. 11 e Eq. 12, respectivamente:

$$\text{IC}_{50} = K_i (1 + [S] / K_m) \quad (\text{Eq. 11})$$

$$\text{IC}_{50} = (K_m + S) / (K_m / K_i + [S] / K_i) \quad (\text{Eq. 12})$$

onde $[S]$ é a concentração do substrato, usado no ensaio, e K_m é a constante de Michaelis, do substrato. Já o valor de K_i (constante de inibição dos compostos) foi definido a partir da equação 13:

$$K_{m, \text{aparente}} = K_m (1 + [I] / K_i), \text{ então}$$

$$K_i = K_m [I] / (K_{m, \text{aparente}} - K_m) \quad (\text{Eq. 13})$$

onde $[I]$ é a concentração do inibidor em μM .

A porcentagem de inibição foi calculada pela equação 14:

$$\% \text{ inibição} = 100 / 1 + (\text{IC}_{50} / [I]) \quad (\text{Eq. 14})$$

3.4 Ensaio de citotoxicidade e ensaios *in vivo*

3.4.1 Animais

Para os testes de atividade citotóxica foram utilizados macrófagos murinos, coletados do peritônio de camundongos da linhagem BALB/c. No total foram utilizadas 3 fêmeas dessa linhagem, com idade de 6 a 12 semanas.

Para os ensaios *in vivo*, 16 machos de camundongos das linhagens C57bl6 foram sedados com isoflurano e infectados pela via intranasal com 2×10^4 células de *C. neoformans*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (UnB), e foram feitos em colaboração com a Profa. Dra. Anamelia Lorenzetti Bocca e a aluna de doutorado Karina Simon. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, com água e comida *ad libitum*.

3.4.2 Teste da atividade hemolítica

Para testar a capacidade hemolítica da molécula inibitória (Mol_3), foi utilizada uma suspensão de hemácias humanas frescas, coletadas em um tubo Vacutainer® com EDTA, de doadores saudáveis, com os procedimentos de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB). As hemácias foram centrifugadas a $800 \times g$, por 5 min a temperatura ambiente, e então lavadas com PBS até que o sobrenadante, após a centrifugação, se apresentasse transparente. Foram feitas, então, duas soluções com 3% de eritrócitos, cujos veículos eram PBS e água destilada estéril, sendo utilizadas como controle negativo e positivo de hemólise, respectivamente.

A molécula 3 foi utilizada em concentrações de 512 $\mu\text{g/mL}$ a 8 $\mu\text{g/mL}$, sempre geradas a partir de diluição seriada com fator 2, em tampão fosfato salino (PBS) estéril, em placas de 96 poços. Em cada poço, foram utilizados 50 μL molécula na diluição desejada, adicionados de 50 μL da suspensão de hemácias em PBS. A placa foi mantida por uma hora em temperatura ambiente.

Após o tempo de espera, a placa foi centrifugada a $800 \times g$ por 5 min. O sobrenadante foi recolhido cuidadosamente e transferido para outra placa de 96 poços, de fundo chato, para ser lida em uma leitora de microplacas no comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram obtidos a partir a equação 15:

$$\% \text{ Hemólise} = (\text{DOs} - \text{DO}_0) / (\text{DO}_{100} - \text{DO}_0) \times 100 \quad (\text{Eq. 15})$$

sendo “DOs” a densidade óptica da amostra, “DO₁₀₀” a densidade óptica do controle positivo para hemólise (hemácias diluídas em água) e “DO₀” é o controle negativo de hemólise (hemácias diluídas em PBS).

3.4.3 Teste da atividade citotóxica em macrófagos murinos

Nesse teste foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, fêmeas, obtidos por meio de lavagem peritoneal com 10 mL de RPMI-1640. Para isso, os animais receberam injeções intraperitoneais de tioglicolato a 4% e permaneceram no biotério do Instituto de Ciências Biológicas por 4 dias, com água e alimento *ad libitum*. Como o experimento foi realizado pela aluna de Doutorado Karina Simon, a metodologia completa é encontrada no **Anexo D**.

3.4.4 Teste da capacidade microbicida *in vivo*

Para verificar a capacidade microbicida da molécula inibitória para o *C. neoformans in vivo*, uma colônia da cepa H99, cultivada em Sabouraud dextrose ágar (SDA), foi inoculada em meio caldo Sabouraud dextrose (SD) e incubada a 30 °C, sob agitação por 24 h. Após o período de crescimento, a cultura foi centrifugada a 3000 × g, por 5 min e o seu sobrenadante descartado. O pellet foi ressuscitado em PBS estéril. Essa lavagem foi repetida mais duas vezes. Após descartar o sobrenadante pela última vez, o pellet foi ressuscitado em PBS, as células contadas em câmara de Neubauer e o inóculo ajustado para a concentração de 8 x 10⁵ cél/mL. Foram utilizados 25 µL desse inóculo em cada um dos animais.

Após 7 dias de infecção iniciou-se o tratamento intranasal com a molécula. O procedimento foi realizado a cada 4 dias, onde 20 µL da molécula 3 a 128 µg/mL foram administrados em cada animal. No 18º e no 28º dias de infecção os animais foram sedados (com 30 µL de solução composta de 15 µL de cloridrato de cetamina a 10% e 15 µL de cloridrato de xilazinan 2%) para recolhimento do soro e em seguida eutanasiados em câmara de CO₂ para recolhimento de pulmão e cérebro afim de realizar-se a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e exame histopatológico desses órgãos. No primeiro, os órgãos foram colocados em tubos estéreis contendo esferas metálicas e homogeneizados no Precellys em 3 ciclos a 4000 rpm por 15 segundos cada e 5 segundos de intervalo entre os ciclos. Após esse processo, 50 µL do homogeneizado foram colocados em placas contendo SDA, que foram incubadas a 30 °C por 48 h para a contagem de colônias.

Para a verificação dos tecidos pulmonar e cerebral, o material foi armazenado em formol tamponado e em seguida incluídos em parafina, cortados com espessura de 5 µm, montados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz comum para que fossem realizadas as descrições histopatológicas das peças.

3.5 Imunocitocalização da proteína Tioredoxina redutase de *C. neoformans*

O processo de imunização dos camundongos e produção de anticorpos monoclonais avaliada e titulada através do ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay*) de forma indireta, foi feito pelos alunos de mestrado e doutorado o Lucas Vieira e a Fabiana Oliveira, seguindo o protocolo descrito por (Hornbeck, 1991).

Localização intracelular da proteína CnTrr1

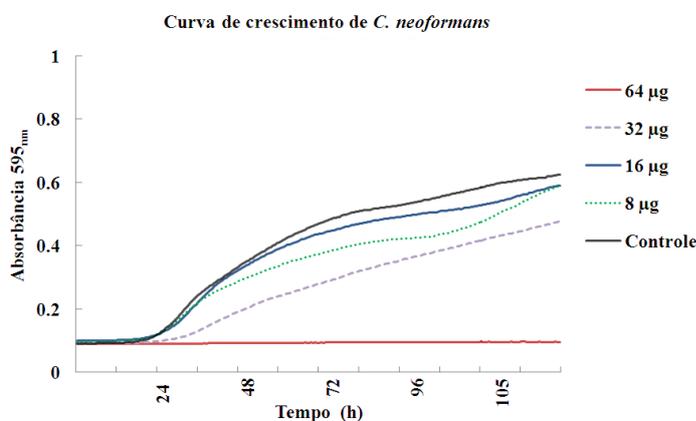
A abordagem por imunofluorescência e microscopia confocal foi utilizada para realizar a localização intracelular da proteína Trr1 em células leveduriformes de *C. neoformans*. As células foram cultivadas em meio YPD por 48 h a 30 °C a 200 rpm, então foram fixadas em solução 1x pH 7 com paraformaldeído 4%, depois foram lavadas e permeabilizadas em metanol a -20 °C e lavadas com PBS 1X. A densidade usada foi de 1×10^7 células/mL e após contagem na câmara de Neubauer, foi feita uma diluição 1:1000 em PBS 1X com 10 µL do soro pré-imune do camundongo, solução que foi adicionada às células e incubada por 1 h com 1 µg/mL do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor® 488 (*ThermoFisher Scientific*), conforme instruções do fabricante; após lavagem e centrifugação as células foram ressuspensas em uma gota do reagente de montagem e manutenção da fluorescência *ProLong Gold Antifade Mountant*, sendo dispostas em lâmina com lamínula para microscopia de fluorescência e incubadas a temperatura ambiente por 24 h, quando foram seladas a imunofluorescência foi realizada no microscópio usando uma objetiva 63X e 100X com abertura numérica (NA) de 1.4, usando o *software Zeis ZEN*. Estes testes foram realizados em colaboração com o Prof. André Nicola da Faculdade de Medicina da UnB.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes *in vitro* das drogas selecionadas

19 moléculas selecionadas previamente por varredura virtual: 2 moléculas chamadas de Top10 *C. neoformans* (CN); 5 moléculas chamadas Top5 específicas para CN; 3 moléculas chamadas de Top10 contra *P. lutzii* (PL); 5 moléculas chamadas de Top5 específicas para PL e 4 moléculas chamadas de Top10 CN e Top10 PL (que atuam para ambos os fungos), foram escolhidas para os testes *in vitro*. Das 19 moléculas com as melhores energias de ligação predita para o modelo de Trr1 de *C. neoformans*, somente 2 delas apresentaram atividade antifúngica *in vitro*. Isso provavelmente em resposta à falta da penetração na parede celular.

As duas que apresentaram inibição para o fungo *C. neoformans* (H99) foram: 1. **mol_3** chamada de top 5 específica para *P. lutzii*, que inibiu a 64 µg/mL (145 µM) (**Figura 46A**), e 2. **mol_14** considerada como top10 CN (selecionada por interagir com o modelo da Trr1 no *docking* virtual com *C. neoformans*), que inibiu até o terceiro poço com 16 µg/mL (32,5 µM) (**Figura 46B**). Esta redução de crescimento demonstra também que as moléculas selecionadas apresentaram um comportamento fungistático e fungicida nas curvas de crescimento, respectivamente.



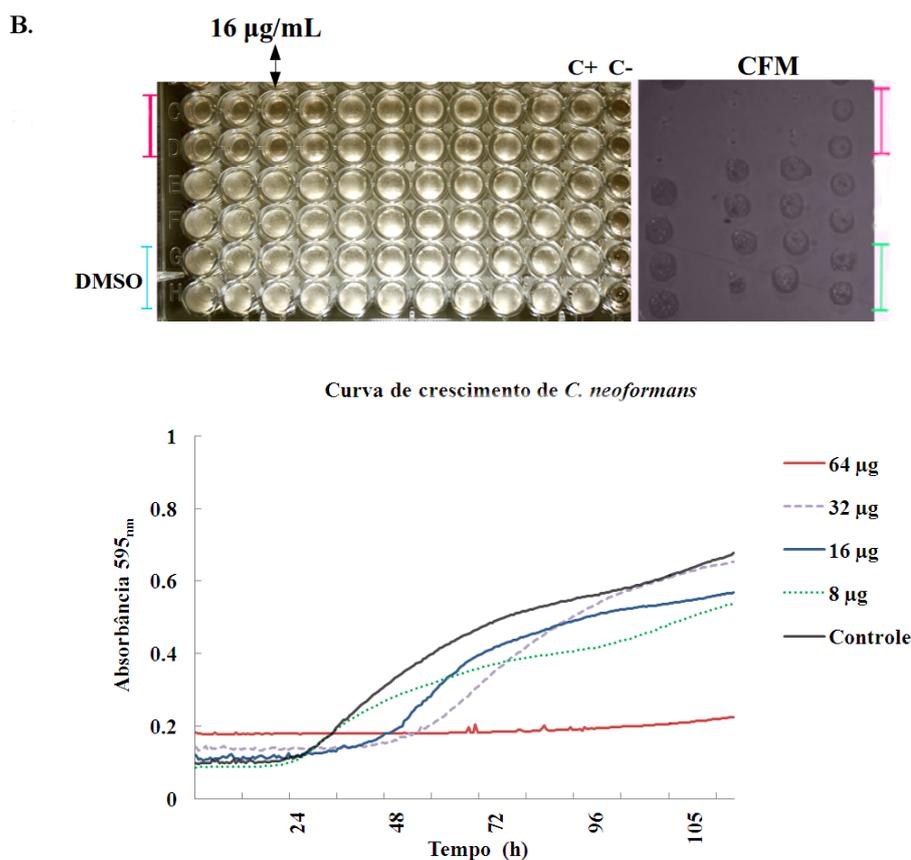
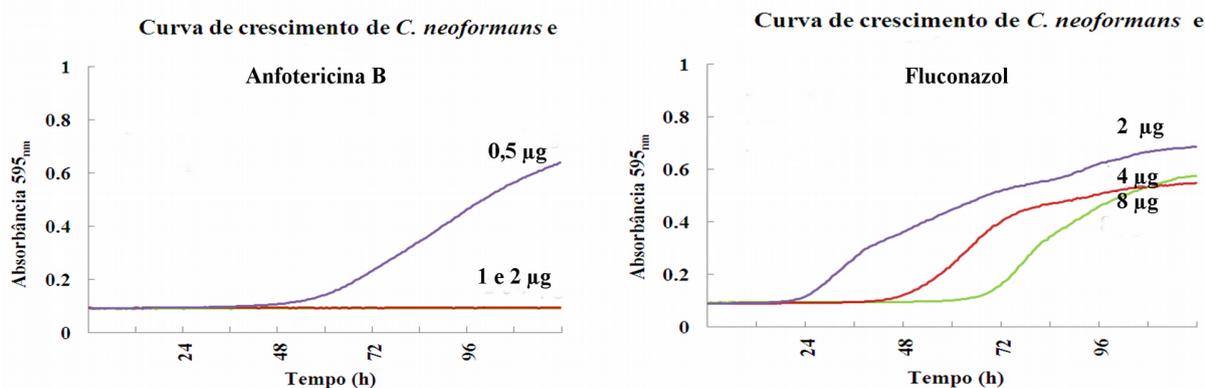
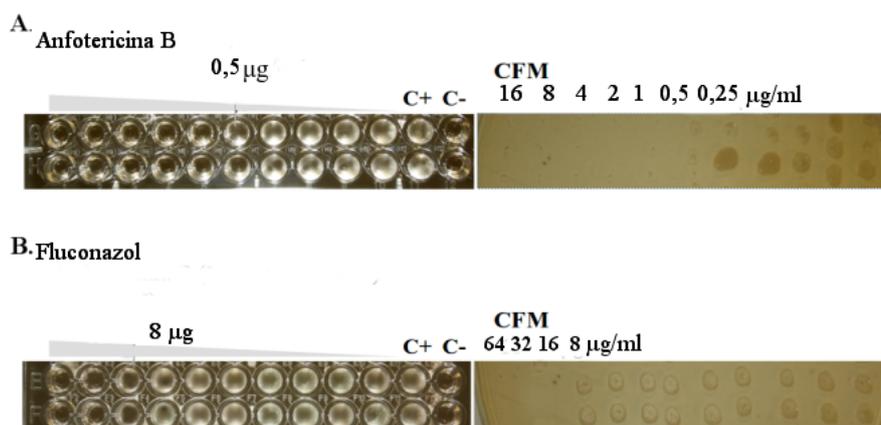


Figura 46. Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* das moléculas contra o fungo patogênico *C. neoformans* (H99). (A) Microdiluição em caldo para determinação visual da CIM, definido como a maior diluição em que não houve crescimento de levedura. Inibição de crescimento de *C. neoformans* em 64 µg/mL com a molécula 3, linha E e F (duplicata); linha G e H: crescimento do fungo em DMSO. C+: controle positivo e C-: controle negativo. A direita, Concentração Fungicida Mínima (CFM), Placas incubadas a 37 °C por 48 h em meio de cultura BHI. A figura abaixo mostra a curva de crescimento da cepa H99 incubada a 37 °C por 110 h em ausência e presença de molécula 3. Controle: H99 no meio sem molécula. (B) CIM da molécula 14. Inibição de crescimento de *C. neoformans* em 16 µg/mL, linha C e D (duplicata); linha G e H: DMSO. A direita CFM. A figura abaixo mostra curva de crescimento da cepa H99 incubada a 37 °C por 110 h em ausência e presença de molécula 14. Comprimento de onda de 595nm com agitação. 64, 32, 16 e 8 µg/mL indicam a concentração da molécula

A anfotericina B e o fluconazol, drogas de referência, alcançaram os menores valores de CIM, 0,5 µg/mL e 8 µg/mL, respectivamente, sendo capazes de inibir o crescimento do fungo *C. neoformans* (H99) *in vitro* (Figura 47).



C.Figura 47. Avaliação da atividade antifúngica in vitro do fluconazol e a anfotericina B no fungo patogênico *C. neoformans* (H99). (A) Placa de diluição seriada com o fluconazol (64–0,125 µg/mL) (esquerda) e CFM (direita). (B) Placa de diluição seriada com a anfotericina B (16–0,031 µg/mL) (esquerda) e CFM (direita). (C) Curva de crescimento da cepa H99 incubada a 37 °C por 110 h em ausência e presença das drogas antifúngicas convencionais.

A leitura espectrofotométrica de testes de microdiluição com a molécula 14 proporcionou uma medida objetiva do crescimento fúngico. O resultado desse experimento permitiu observar que nas concentrações 32 e 16 µg/mL, existe uma inibição de crescimento da cepa H99 até aproximadamente 48 h de incubação, depois desse tempo o fungo é capaz de crescer, demonstrando o efeito fungistático dessa molécula; ao invés, a molécula 3 provocou morte da célula fúngica (efeito fungicida) na concentração de inibição a 64 µg/mL.

A partir de esses resultados e tendo duas moléculas inibidoras para a cepa padrão (valores de CIM em µM de 145 (Mol_3) e 32,5 (Mol_14), foram testadas adicionalmente 5 cepas clínicas de *C. neoformans* isoladas de pacientes (*Cn115* PEC/CFP, *Cn119* PEC/CFP, *Cn160* PEC/CFP, *Cn191* PEC/CFP, *Cn223* PEC/CFP), com as 2 moléculas com potencial antifúngico, que afetaram o

crescimento da cepa H99. As cepas foram disponibilizadas pela Dra. Profa. Patricia Albuquerque e o Dr. Prof. André Nicola, professores da Universidade de Brasília (UnB). Como observado na **Tabela 12** (CIM * $\mu\text{g/mL}$) as duas moléculas testadas apresentaram atividade antifúngica contra as cinco cepas clínicas, as quais foram afetadas com um CIM mais baixo para a Mol_14, assim, as moléculas inibiram em baixas concentrações os isolados clínicos de *C. neoformans* (8 $\mu\text{g/mL}$) em comparação com o CIM apresentado para a cepa H99 do mesmo fungo (16 $\mu\text{g/mL}$). Como esperado as drogas de referência foram ativas contra as cepas clínicas de *C. neoformans*.

Tabela 12. Atividade antifúngica *in vitro* das moléculas selecionadas pela varredura virtual

Molécula / droga referência	Microrganismo (Cepa H99 e Cepas clínicas de <i>C. neoformans</i>)	CIM- $\mu\text{g/mL}$
Molécula 3	H99	64
	Cn115	-
	Cn119	32
	Cn160	64
	Cn191	-
	Cn223	64
Molécula 14	H99	16
	Cn115	16
	Cn119	8
	Cn160	16
	Cn191	8
	Cn223	8
Fluconazol	H99	8
	Cn115	8
	Cn119	4
	Cn160	8
	Cn191	4
	Cn223	4
Anfotericina B	H99	0,5
	Cn115	4
	Cn119	0,25
	Cn160	2
	Cn191	2
	Cn223	2

Embora tenham sido relatados isolados com susceptibilidade diminuída a anfo B, o padrão de susceptibilidade das cepas de *C. neoformans* é bastante previsível, produzindo valores de CIM em uma

faixa entre 0,12 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (NCCLS, 2008; Moares *et al.*, 2003). Já para o fluconazol, os pontos de corte relevantes para *Cryptococcus* são: CIM < 8 $\mu\text{g/mL}$ susceptíveis, 16 a 32 $\mu\text{g/mL}$ como susceptíveis dose-dependentes e CIM > 64 $\mu\text{g/mL}$ como resistentes (Lee *et al.*, 2012).

4.2 Avaliação da inibição de UFC (Unidade Formadora de Colônias)

Conforme a leitura visual e obtenção de CIM, foram avaliadas 2 concentrações para as moléculas inibitórias (64 e 32 $\mu\text{g/mL}$) e a concentração para a anfotericina B (2 $\mu\text{g/mL}$), para avaliar a contagem de UFC em *C. neoformans* (H99). Após incubação por 110 h e posterior plaqueamento em ágar YPD a 37 °C / 2 dias, o número de células viáveis nas suspensões celulares tratadas e não tratadas foi determinado através da contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL (**Figura 48**).

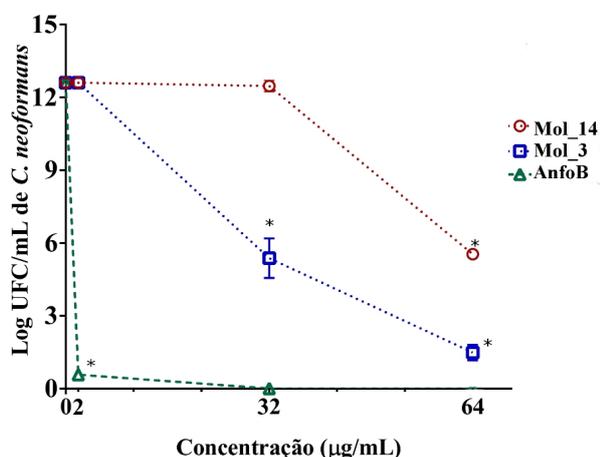


Figura 48. Atividade antifúngica dos compostos sobre *C. neoformans*: Log UFC/mL. Número de *C. neoformans* após cultura celular em presença e ausência dos diferentes compostos. As barras de erro representam o erro padrão da média. Controle: H99 no meio sem molécula (0 $\mu\text{g/mL}$). * Diferença significativa para porcentagem de inibição de UFC entre as condições testadas em comparação com o controle, (ANOVA- Teste de Dunnet $p < 0,0001$).

As concentrações testadas foram 64 e 32 $\mu\text{g/mL}$ para a molécula 3, resultando em inibição de 89% e 57%, respectivamente, das UFC da cepa H99. Já para a molécula 14 observou-se uma menor redução de UFC, assim, 64 $\mu\text{g/mL}$ inibiram 55% das UFC de *C. neoformans*, enquanto que com 32 $\mu\text{g/mL}$ do composto o percentual de células viáveis não foi diferente do controle não tratado. A ação antifúngica de apenas 2 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B resultou em inibição de 96% UFC, corroborando que os agentes antifúngicos polienos são fungicidas (Pfaller *et al.*, 2004).

4.3 Efeito das moléculas inibitórias na morfologia das células de *C. neoformans*.

As leveduras são fungos unicelulares, morfologicamente são ovaladas (*C. neoformans*), ou redondas (*s. cerevisiae*), entre outras. A gemação de novas células ocorre pela formação de pequenas protuberâncias na superfície da célula que, depois de se desenvolverem, se desprendem da célula mãe. O padrão morfológico do fungo tem sido descrito como característico por diversos autores: apresenta

uma célula central, com presença de um núcleo, circundada por uma cápsula espessa (polissacarídica) que geralmente não se cora pela hematoxilina e eosina (HE) (Okagaki *et al.*, 2010; McFadden *et al.*, 2006). Essas características permitiram definir critérios para avaliar alterações após o tratamento com as moléculas inibitórias.

Para avaliar o efeito das moléculas inibitórias na morfologia das células de levedura de *C. neoformans* 100 células de cada tratamento incubadas 110 horas a 37 °C foram observadas e aquelas que apresentavam alterações foram quantificadas. Inicialmente na **Figura 49A**, a percentagem de alterações morfológicas em relação ao número total de células nas diferentes concentrações usadas, indicam que as mudanças são dose-dependentes. Observou-se que as leveduras tratadas com altas concentrações da molécula inibitória têm defeitos de citocinese mais evidentes. Na concentração de inibição de 32 µg/mL para a molécula 14 as leveduras tratadas apresentam-se grumadas, com número aumentado de células com 4 ou mais brotos presos (~17%) quando comparadas com as células não tratadas (0%) e com concentrações mais baixas (8 µg/mL) (1%). Na concentração de 32 µg/mL foi também observado que o número de células normais (1-2 células) diminuiu em relação com as células controle que se dividiram normalmente. Quando as células são tratadas com a molécula 3 na mais alta concentração, ~12% de células filhas permaneceram presas à célula mãe formando grumos recorrentes de 3 em 3 células e novamente as células tratadas nessa concentração tiveram uma redução significativa de leveduras em relação com as células não tratadas.

A microscopia DIC demonstrou que a maioria das células permanece presa após o tratamento com ambas as moléculas. Variações na quantidade de brotamentos foram observadas com a adição das moléculas. Os resultados sugerem que o tratamento causa alterações morfológicas devido aos defeitos de replicação celular. Provavelmente estão sendo gerados danos celulares que desencadearam defeitos no ciclo celular. Adicionalmente, nas observações microscópicas foi detectado aspecto vacuolizado e um tamanho celular aumentando, sendo que no interior de algumas células foi possível observar material granular, por vezes arredondado (**Figura 49B**).

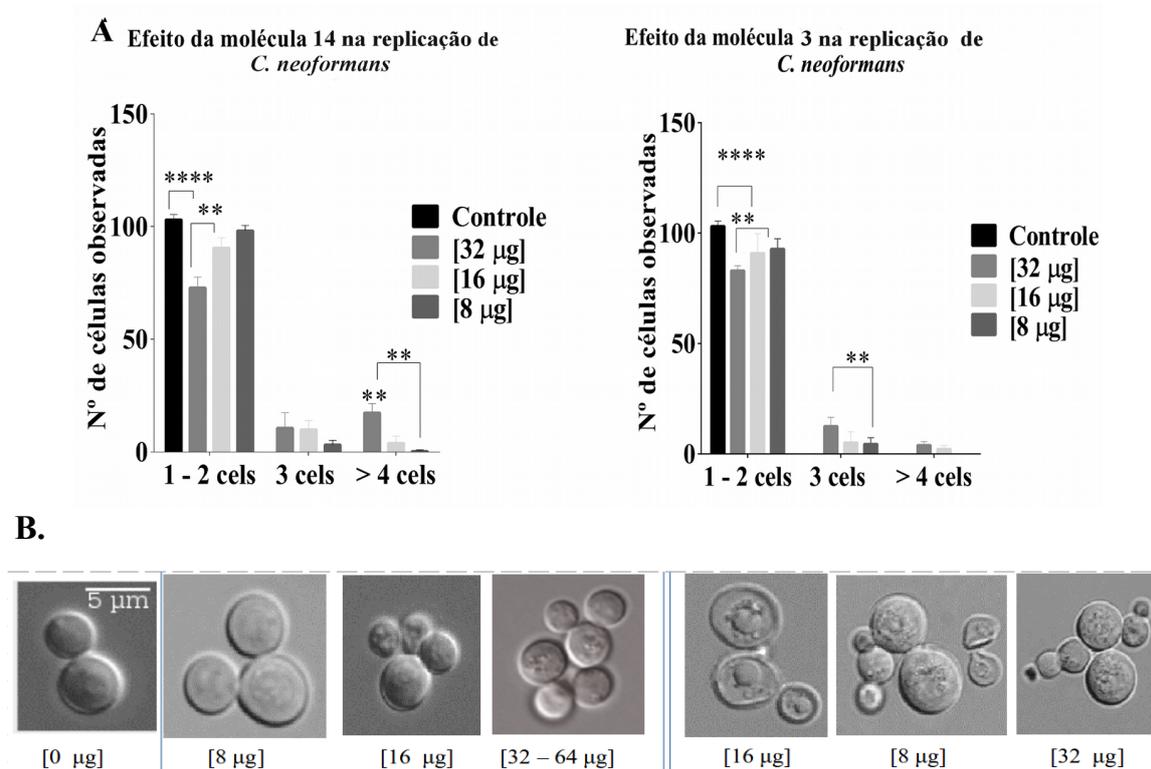


Figura 49. Efeito das moléculas na replicação de *C. neoformans*. (A) Contagem do número de células fúngicas de acordo com o efeito causado pelas diferentes concentrações das moléculas avaliadas após 110 h de incubação a 37 °C. Diferença significativa entre as concentrações das moléculas em 100 células. (ANOVA ($p < 0,05$); pós teste de Tukey). (B) Observação morfológica das células fúngicas após tratamento com as moléculas inibitórias. Controle: 0 µg, células não tratadas. Molécula 14 (direita) e Molécula 3 (esquerda). 1-2 cels: células apresentam uma divisão normal, 3 ou >4 cels: células grumadas com defeito para se dividir normalmente.

Estudos recentes nas mudanças morfológicas após o tratamento de leveduras haplóides com agentes antifúngicos que perturbam três conhecidos alvos- a biossíntese do ergosterol, ácido nucleico e vias de biossíntese da parede celular, revelaram que as células tratadas com fluconazol (FCZ), flucitosina (FCS), equinocandina (ECB), micafungina (MCF), entre outros, apresentaram um fenótipo morfológico aberrante. A nistatina, um agente de ligação ao ergosterol, não foi avaliada por causar lise nas células. Os resultados também indicaram dose-dependência, sugerindo que mudanças morfológicas se tornam progressivamente mais evidentes no aumento da concentração dos antifúngicos (Gebre *et al.*, 2015). As principais mudanças observadas foram: células redondas, núcleos grandes, células mãe grandes, brotamentos longos e estreitos, células mãe grandes com brotamentos pequenos, etc.

Outro estudo, demonstrou que o itraconazol teve um menor efeito na morfologia celular quando a proliferação celular foi avaliada as 24, 48 e 72 h após aplicação da droga na célula fúngica comparado

com natamicina e miconazol. Em baixas concentrações, natamicina e miconazol induziram arredondamento celular, encolhimento das células e inibição da proliferação celular. Adicionalmente, o DMSO teve efeitos mínimos sobre a morfologia e proliferação celular, mesmo em altas concentrações (60, 6 µg/mL) (Mathes *et al.*, 2010). O mesmo resultado foi observado no nosso estudo, onde o DMSO (1%) não alterou a morfologia das células fúngicas (dados não mostrados).

A análise de microscopia eletrônica de varredura em espécies de *C. neoformans* identificou que na presença de 128 µg/mL de fisetina, um flavonoide com atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, as células mudam a sua morfologia normal originando células globulares com uma superfície relativamente lisa, exceto por pequenas protrusões raras e grandes grânulos ao redor. Segundo Reis e cols., a fisetina poderia estar inibindo o teor de ergosterol das células de *C. neoformans*, afeta a viabilidade e o metabolismo, e leva a alterações morfológicas (Reis *et al.*, 2016). Embora nosso estudo não tenha avaliado em detalhe essas mudanças morfológicas (destruição de organelas no citoplasma e morfologia alterada da membrana celular) e seja difícil explicar o mecanismo destes compostos na morfogênese das células fúngicas relacionada à inibição de crescimento, Reis e cols., mostraram que essas características morfológicas que experimentam as células com a adição de alguns compostos, são devidas a problemas do metabolismo normal nas células fúngicas, que no caso dos inibidores de *CnTrr1* poderiam ser explicados por acúmulo de danos oxidativos, devido a inibição deste importante complexo enzimático.

4.4 Ensaio de inibição enzimática

Ensaio de atividade enzimática preliminares foram necessários para determinar o melhor intervalo de concentração e tempo de cinética a serem utilizados para cada concentração de substrato durante a reação de catálise. Os estudos cinéticos da enzima *Trr1* recombinante de *C. neoformans* foram realizados com o substrato *Trx1* recombinante do mesmo organismo.

Os parâmetros cinéticos foram determinados variando a concentração de *Trx1* de 0,25 µM até 15 µM (**Figura 50**), traçando o gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk. A curva de atividade da enzima foi monitorada pela formação de TNB, para diferentes concentrações do substrato. Os valores de K_m e $V_{máx}$ foram $1,344 \pm 0,1977$ µM, e $0,003697 \pm 0,0001$ µM/s, respectivamente. A velocidade de reação aumentou gradualmente à medida que a concentração de substrato aumentava, mostrando assim a capacidade de *Trr1* em reduzir *Trx1*. Esses ensaios possibilitaram avaliar a atividade enzimática desta proteína alvo.

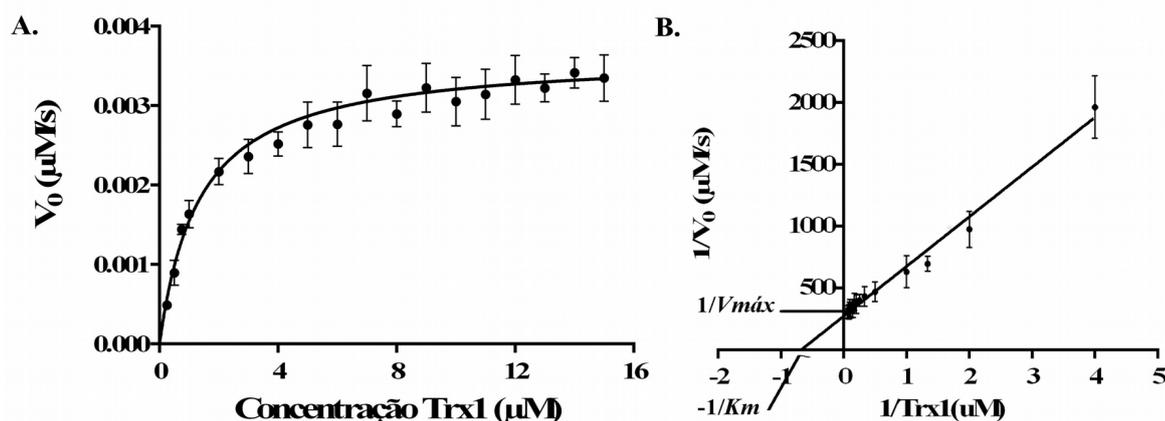


Figura 50. Determinação de K_m e $V_{máx}$ de $CnTrr1$ utilizando o substrato $CnTrx1$. (A) Medida de redução de tioredoxina a 412nm a temperatura ambiente. Reação iniciada com a adição de $Trr1$ $0,09 \mu M$. Curva de Michaelis-Menten para determinar K_m e $V_{máx}$ para o substrato $Trx1$. A curva foi ajustada usando regressão não-linear. (B) Duplo-recíproco Lineweaver-Burk. O K_m é a concentração do substrato μM , na qual a velocidade inicial da reação é metade da velocidade máxima. $K_m = 1,34 \mu M$, $V_{máx} = 0,0036 \mu M/s$.

A eficiência catalítica de $CnTrr1$ foi determinada pelos aparentes parâmetros cinéticos $K_{cat}/K_m = 29,8 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$, que sugere uma eficiência catalítica, que é consistente e próxima daquelas relatadas para outras tioredoxinas redutases (Godoy *et al.*, 2016; Bauer *et al.*, 2003; Kanzok *et al.*, 2000). Oliveira e cols., mostraram que a $Trr1$ de *S. cerevisiae* apresenta afinidade pelas $Trx1$ e $Trx2$ da mesma espécie, a eficiência catalítica esteve na ordem de $7,3 \pm 1,5 \times 10^7$ e $3,4 \pm 1,2 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$. No entanto a enzima não conseguiu reduzir a Trx de *E. coli* e a $Trx1$ humana. Dessa forma a $ScTrr1$ apresentou atividade redutase espécie-específica, ou seja, só reduz tioredoxinas de levedura (Oliveira *et al.*, 2010). Outro estudo similar demonstrou que com os ensaios de atividade enzimática $Trr1$ e $Trr2$ podem reduzir a $Trx3$ mitocondrial de *S. cerevisiae*, embora elas estejam localizadas em diferentes compartimentos sub-celulares.

Para verificar se as moléculas inibitórias são capazes de inibir especificamente a proteína recombinante $Trr1$ de *C. neoformans*, ensaios de inibição foram realizados usando $CnTrx1$ nas concentrações $0,25$; $0,5$; $1,0$; $2,0$; $4,0$ e $6,0 \mu M$ para Mol_{14} , e para a Mol_3 foram selecionadas 3 concentrações $1,0$; $4,0$ e $14,0 \mu M$. Os inibidores foram avaliados nas concentrações 16 (CIM, molécula_14 = $32,5 \mu M$), 32 , 64 (CIM, molécula_3 = $145 \mu M$) e $128 \mu g/mL$. Os estudos realizados em triplicata confirmaram a inibição de $Trr1$ pelo composto. O método experimental consistiu em medir a velocidade de reação na ausência e presença de diferentes concentrações de inibidor, com variação das concentrações de substrato. Para realização dos ensaios de inibição utilizou-se o método de linearização de Lineweaver-Burk. (Figura 51).

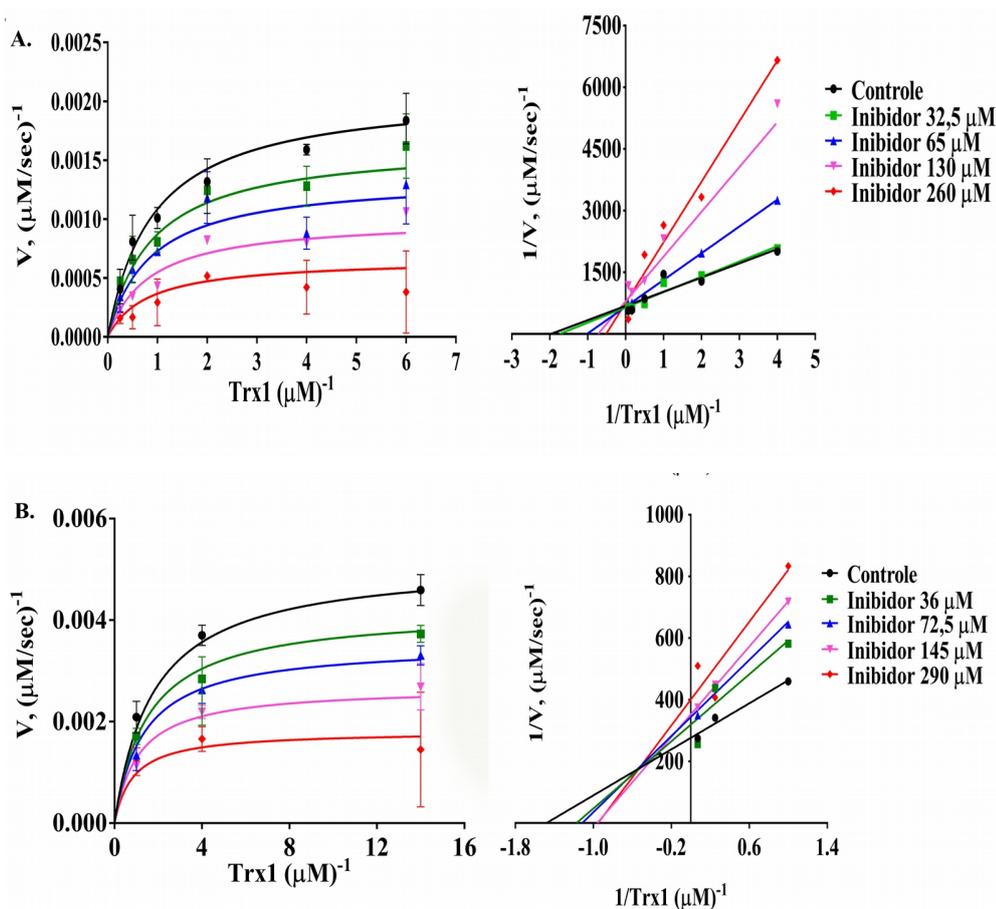


Figura 51. Representação gráfica de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk mostrando o perfil de inibição da enzima tioredoxina redutase recombinante pelos compostos (A) 14 e (B) 3. O gráfico de regressão linear é expresso como $1/V_0$ versus $1/[\text{Trx1}]$ (μM) na presença e ausência de inibidor μM .

O resultado obtido na inibição da tioredoxina redutase pela molécula 14 apresentou um perfil de inibição com tendência competitiva. A informação obtida permite estabelecer que este composto provavelmente compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima. No estudo de cinética enzimática para esse composto foi verificado que o valor de V_{max} não varia, enquanto que o valor de K_m aumenta. Já para a molécula 3 o perfil de inibição sugere a presença de um inibidor misto, ou seja inibidores que podem se ligar tanto à enzima livre como ao complexo enzima-substrato. Nesse caso, o inibidor se liga a um local diferente do local ativo para causar uma mudança conformacional na estrutura enzimática, reduzindo a afinidade do substrato. Na inibição mista, o V_{max} aparente muda, porque o inibidor é capaz de evitar a catálise, independentemente do substrato estar ligado à enzima (**Tabela 13**).

Tabela 13. Parâmetros cinéticos de inibição da tioredoxina reductase pelas moléculas.

$\mu\text{g/mL}$	$-1/K_m$ (μM)		$1/V_{\text{max}}$ ($\mu\text{M/s}$)		R^2	
	Mol_14	Mol_3	Mol_14	Mol_3	Mol_14	Mol_3
0	1,968	1,480	0,0028	0,0053	0,98	0,96
16	1,743	1,173	0,0027	0,0036	0,95	0,96
32	1,018	1,113	0,0026	0,0032	0,93	0,93
64	0,727	0,959	0,0025	0,0027	0,90	0,93
128	0,512	0,951	0,0023	0,0021	0,90	0,89

Os valores de K_i e IC_{50} são frequentemente usados para comparar a potência relativa dos inibidores. Para K_i , valores menores indicam uma ligação forte do inibidor pela enzima. Do mesmo modo, valores baixos de IC_{50} sugerem melhor inibição. Assim, os valores da constante de inibição (K_i : afinidade de ligação do inibidor) foram: 36,9 μM para a molécula 14 e 106,7 μM para a molécula 3. Os valores de IC_{50} (concentração de substrato para que haja 50% de inibição da atividade da enzima), considerando uma concentração de 1 μM do substrato *CnTrx1*, foram: 67,8 μM para a inibição competitiva (Mol_14), e 110,8 μM assumindo uma inibição mista (Mol_3). A porcentagem de inibição da *CnTrx1* com a molécula 14 (32,5 e 260 μM de substrato) foi de 33% e 80%, respectivamente, enquanto que a porcentagem de inibição da *CnTrx1* pela molécula 3 (36 e 290 μM) foi de 25% e 73%, respectivamente.

A partir desses resultados foi possível identificar uma maior afinidade da molécula 14 que, com uma concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$ de inibidor consegue inibir melhor a enzima. Como os valores IC_{50} calculados comparáveis estão na faixa microomolar, é sugerido que uma das principais limitações destes compostos é a sua fraca solubilidade em água o que poderia dificultar a biodisponibilidade do composto *in vitro*, que resulta em um inibidor ligeiramente mais fraco em *Trx1* quando comparado com outros compostos solúveis (inibidores de *hsTrxR*) com IC_{50} na faixa nanomolar, sendo mais eficientes contra a *TrxR* citosólica do que a *TrxR2* mitocondrial (Gandin e Fernandes, 2015).

Ensaio de inibição da atividade da *TrxR* do protozoário *P. falciparum* com inibidores específicos, mostraram três promissores inibidores, sendo que o inibidor mais potente apresentou $IC_{50} = 0,5 \mu\text{M}$. Além disso a inibição de *PfTrxR* foi encontrada por ser não competitiva com respeito a ambos os substratos *Trx* e *NADPH* (Andricopulo *et al.*, 2006). Na atualidade somente existe um estudo que demonstra a atividade de potenciais inibidores da *Trx1* em fungos patogênicos (*P. lutzii*). Os autores mostraram que embora essas concentrações de inibição sejam elevadas (19 e 260 μM), as moléculas inibiram diretamente o alvo *Trx1*, porém valores de K_i , IC_{50} ou % de inibição não foram reportados (Abadio *et al.*, 2015).

Vários estudos tem relatado que a maioria dos inibidores enzimáticos de Trr, TryR ou GR, se ligam na proximidade do sítio ativo (Cys), com valores aparentes de K_i entre 0,1-64 μM (Saccoccia *et al.*, 2014). Como exemplo o 3,4-dihidroquinazolina inibidor da Tripanotione redutase (TryR) de *T. brucei*, que gera um pequeno bolso de ligação no local ativo, exposto ao solvente (IC_{50} de 6,8 e 67 μM). Adicionalmente um *screening* de análogos comerciais demonstrou uma potência melhorada com respeito as modificações estruturais do composto onde foram encontrados valores $\text{IC}_{50} = 1 \mu\text{M}$ (Patterson *et al.*, 2011). A maior afinidade desses compostos derivados de modificações estruturais aumentam as chances para o desenvolvimento de um composto *lead* para o tratamento antifúngico. Da mesma forma, no nosso grupo serão realizadas modificações na estrutura química das 2 moléculas inibidoras apresentadas neste estudo, visando um aumento da eficiência antifúngica contra *C. neoformans* com o intuito de gerar compostos mais eficientes para o tratamento de infecções fúngicas.

Os ensaios cinéticos preliminares e as poses de ligação dos compostos avaliadas *in silico*, contribuem para uma melhor interpretação, de forma a entender em qual sítio de ligação o composto tem mais afinidade. Segundo os dados das Tabelas 9 e 10 do capítulo I, as duas moléculas apresentaram maior afinidade de ligação onde o cofator FAD se liga na conformação FO. Já na conformação FR da enzima, ambos os compostos tem afinidade pelo sítio que ocupa o substrato e se ligam perto do sítio ativo, porém continuam tendo preferência pelo sítio que ocupa o NADPH, quando o docking é avaliado com a presença do cofator FAD. No entanto, esse mecanismo não comprova de forma direta a ligação, já que várias poses foram observadas em ambos compostos. Por isso, estudos cristalográficos destes inibidores co-cristalizados com a *CnTrr1* serão realizados a modo de verificar os tipos de ligações e os sítios favoráveis das moléculas testadas.

4.5 Citotoxicidade

Além dos efeitos do composto alvo, a determinação da toxicidade é importante antes de considerar um composto como uma droga potencial. No caso das moléculas 14 e 3, não há evidência sobre a toxicidade a curto ou longo prazo destes compostos.

Os resultados demonstraram um grau de hemólise (8- 512 $\mu\text{g/mL}$) abaixo de 25% (**Figura 52**). A ausência da atividade hemolítica em eritrócitos sugere que a citotoxicidade da molécula em estudo não está relacionada ao dano da membrana. Os efeitos hemolíticos de drogas em eritrócitos humanos têm mostrado que as drogas iônicas apresentam diferenças características nas atividades hemolíticas. Os fármacos catiónicos produzem uma lise severa, enquanto que os fármacos aniônicos causam hemólise

em uma concentração mais elevada do que os catiônicos (Aki e Yamamoto, 1991). Takahashi e cols., (2013), demonstraram que com a anfotericina B em diferentes concentrações (7,81-500 µg/mL), há um índice de hemólise de ~80% para as concentrações acima de 62,5 µg/mL.

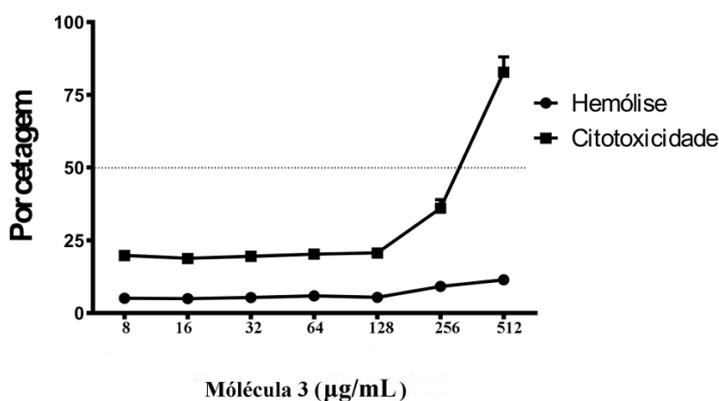


Figura 52. Citotoxicidade da molécula 3 por método *in vitro*. Detecção de hemólise em eritrócitos humanos e percentual de células mortas dos macrófagos murinos estimulados pela molécula inibitória.

Além do teste de atividade hemolítica, a molécula foi testada quanto ao seu potencial citotóxico para macrófagos peritoneais de camundongos, coletados 72 h após a injeção intraperitoneal de tioglicolato a 4%, e mantidas em estufa úmida a 37 °C. Essas células foram utilizadas para o experimento 24 h após serem coletadas. No teste de citotoxicidade, as células foram estimuladas com concentrações da molécula 3 que variaram de 18 >1000 µM (**Figura 52**). A molécula 3 não apresentou citotoxicidade até 580 µM (256 µg/mL), um indicativo de ausência de morte celular.

Foi observado um percentual abaixo de 20% de citotoxicidade para a maioria das concentrações avaliadas, indicando que o composto 3 é uma molécula promissora para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas. Resultado semelhante foi encontrado por nosso grupo de pesquisa onde foi verificado o efeito tóxico de três compostos selecionados por *virtual screening* contra o alvo Trr1 de *P. lutzii*. Os macrófagos J774 mostraram mais de 80% de viabilidade nas concentrações inferiores de 260, 77 e 269 µM para 3 compostos F08, F18 e F33, respectivamente, sendo esses últimos dois os que apresentaram menor citotoxicidade (Abadio *et al.*, 2015).

4.6 Ensaios *in vivo*

Para verificar a capacidade antifúngica da molécula 3 para o *C. neoformans in vivo*, camundongos da linhagem C57bl6 foram infetados intranasalmente. Após 7 dias de infecção iniciou-se com o tratamento da molécula 3 (~ 0,1 mg/Kg) a cada 4 dias por via intranasal. A **Figura 53**, representa a carga fúngica que foi medida pela contagem de UFC do fungo no pulmão e no cérebro após 18 e 28 dias de infecção. Os órgãos foram pesados após extração para normalização dos dados de UFC/mg de tecido.

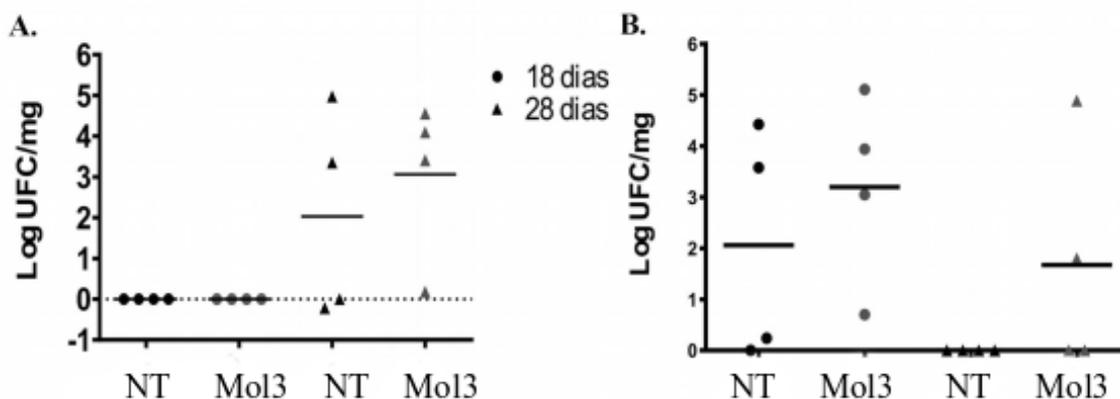


Figura 53. Logaritmo do número de UFC/mg encontrado (A) no cérebro e (B) no pulmão dos camundongos infectados via intranasal com a cepa H99, e pertencentes aos grupos não-tratado (NT) e tratado (Mol_3), sacrificados respectivamente com 18 e 28 dias de infecção. Cada ponto representa um animal e a barra indica a média da carga fúngica para aquele grupo. Teste estatístico Anova-Tukeys.

Na **Figura 53A**, o resultado das médias da contagem das colônias de *C. neoformans* provenientes do cérebro dos animais do grupo tratado e não tratado, mostrou que não foram observadas UFC no sistema nervoso central no 18° dias após infecção, enquanto que com 28° dias já é observado o aumento no número de UFC no grupo não tratado. O aumento no número de UFC desse grupo não foi estatisticamente significativo quando comparado com o tratamento da molécula 3, de modo que nesse período a molécula não inibiu o crescimento da levedura. Na **Figura 53B**, é apresentado o número de UFC do pulmão dos animais tratados e não tratados, a diferença da figura A, pode se verificar que com 18 dias de infecção já há um número elevado de UFC nos pulmões dos animais não tratados, porém, também foi observado nos animais tratados com a molécula inibitória. Com 28 dias de infecção a molécula não conseguiu inibir o crescimento do fungo nos pulmões. No grupo controle, aparentemente, a ausência de UFC observada no dia 28° se deve a que os animais não foram susceptíveis à infecção.

Várias observações poderiam explicar porque o tratamento com a molécula não reduz a carga fúngica nos tecidos. A possibilidade de degradação do composto, pode ser considerada, uma vez que o bioensaio não revelou a atividade biológica do antifúngico no cérebro nem no pulmão. A falta de eficácia e menor atividade do composto poderia ser devida ao surgimento de resistência do fungo, no tempo de espera para o tratamento e a baixa concentração aplicada intranasalmente. Provavelmente, se houve-se uma maior frequência da dose da molécula os animais poderiam exibir uma infecção menor em relação ao grupo controle. Segundo Larsen e cols. (2003), não se sabe se as concentrações de drogas utilizadas *in vitro* correspondem àquelas necessárias para tratamento murino.

Os resultados de citotoxicidade e atividade *in vivo* para a molécula 14 foram realizados pela Profa. Dra. Erika Seki Kioshima, da Universidade Estadual de Maringá, e encontram-se no ANEXO E, desta tese.

4.7 Imunocitocalização da proteína Tiorredoxina redutase em *C. neoformans*

Com base nos relatos encontrados na literatura de localização da proteína Trr1 na superfície celular de vários patógenos, direcionamos o trabalho na localização celular da Trr1 em *C. neoformans*. Neste sentido, foram executados experimentos para determinar a citocalização desta proteína através da colaboração e supervisão do Prof. Dr. André Nicola.

A citocalização mostrou que os anticorpos policlonais antiTrr1, produzidos a partir da imunização de camundongos, foram capazes de reconhecer a estrutura da proteína em células leveduriformes de *C. neoformans*. A partir de imagens de microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) foi possível identificar a presença de células integras em primeiro plano e brotamentos em segundo plano (**Figura 54**). Essas mesmas imagens, ao serem analisadas por microscopia de fluorescência (MF) demonstraram a existência de um padrão de fluorescência compatível com a literatura, com a apresentação da proteína Trr1 de maneira mais evidente na superfície da célula. As marcações intracelulares das células visualizadas mostram que é necessário realizar uma co-localização com marcadores organelares para conhecer especificamente essa posição intracelular.

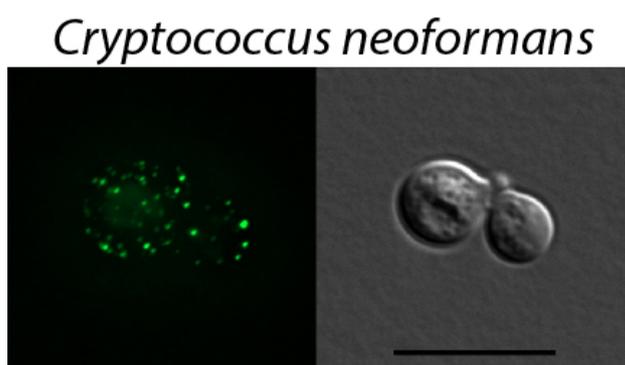


Figura 54. Imunocalização de Trr1 em levedura de *C. neoformans*. A levedura fúngica foi incubada com soro de camundongos imunizados com Trr1 recombinante. Após a incubação com soro, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 488 para coleta de imagens por epifluorescência seguida de deconvolução (*CnTrr1* - à esquerda no painel) ou contraste por interferência diferencial (DIC - à direita). As barras de escala correspondem a 10 micrômetros.

Trr1 é conhecida por ser uma proteína citosólica, no entanto, Missall e cols, através da fusão da proteína verde fluorescente (GFP) à região 3' do gene da tioredoxina redutase, mostraram a localização e expressão desta enzima na linhagem H99 de *C. neoformans*. As células tipo selvagem que não expressam GFP mostraram um ligeiro anel de autofluorescência ao redor da superfície celular. Durante o crescimento logarítmico em meio rico, Trr1 está localizada ao longo da célula, mostrando preferência pela mitocôndria, mas também é vista no citoplasma. No brotamento das células, Trr1 é geralmente localizada na célula mãe, mas é vista nas mitocôndrias em ambas as células mãe e filhas. Segundo estes autores, como *C. neoformans* ao contrário de *S. cerevisiae*, não codifica para um sistema tioredoxina mitocondrial separada, parece que a única enzima tioredoxina redutase funciona para ambas as formas citoplasmática e mitocondrial (Missall e Lodge, 2005). Sendo assim, a função das proteínas pode variar como consequência da alteração na sua localização celular, no estado organizacional ou na concentração da célula de um ligante, substrato, cofator ou produto.

5. CONCLUSÕES CAPÍTULO II

- 2 moléculas selecionadas da varredura virtual apresentaram atividade antifúngica contra *C. neoformans*. Os valores de CIM para as moléculas 14 e 3 foram, 16 e 64 µg/mL, respectivamente.
- Na concentração de 32 µg/mL as moléculas 3 e 14 afetam a citocinese.
- As moléculas inibitórias, 3 e 14, inibem a proteína recombinante *CnTrr1*.
- Não foi observada atividade hemolítica ou potencial citotóxico da molécula 3 nos testes *in vitro*.
- Com 28° dias de infecção a molécula 3 não conseguiu inibir o crescimento do fungo nos pulmões ou cérebro dos camundongos infectados, isso devido provavelmente á concentração de droga administrada.
- O experimento da citolocalização mostrou que a proteína *Trr1* é encontrada de maneira mais evidente na superfície da célula fúngica.



CAPÍTULO III

**Estudos funcionais da tioredoxina redutase, um gene
essencial no fungo patogênico *C. neoformans***

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Gerar informações básicas sobre o papel do *CnTRR1* na manutenção da viabilidade celular no fungo patogênico *C. neoformans*.

1.2 Objetivos específicos

- a) Substituição do promotor nativo pelo promotor regulado por cobre (P_{CTR4-2}) para modulação da expressão de *TRR1* em *C. neoformans*.
- b) Caracterização dos fenótipos (viabilidade celular e resistência ao estresse oxidativo) do mutante condicional para *TRR1*, bem como os fenótipos associados a inibição de *TRR1* pelas drogas inibidoras selecionadas.
- c) Construção de *Trr1* fundida com a proteína fluorescente mCherry para citolocalização.

2. FUNCIONALIDADE DO GENE ESSENCIAL *TRR1* EM FUNGO *C. NEOFORMANS*

No **capítulo III**, está apresentado o estudo funcional do gene *TRR1* de *C. neoformans*. Os genes "essenciais" não podem ser deletados ou mutados sem causar inviabilidade ao organismo, embora esta definição depende das condições de crescimento (Ianiri e Idnurm, 2015). Em *C. neoformans* a deleção de *TRR1* resulta na perda de viabilidade, enquanto que, mutantes *trx1* apresentam um defeito grave de crescimento e são sensíveis ao estresse oxidativo (Missall e Lodge, 2005; Upadhya *et al.*, 2013). A natureza essencial de *TRR1* em *C. neoformans*, foi demonstrada por dois estudos experimentais que incluem, o uso de promotores condicionais e análise do fenótipo sob condições repressivas ou induzíveis (Missall e Lodge, 2005) e mais recentemente através de abordagens genéticas diretas e reversas, usando uma cepa diplóide manipulada e segregação genética após meiose (Ianiri e Idnurm, 2015).

Sendo assim, a estratégia usada neste trabalho foi baseada na identificação do gene *TRR1* e substituição do promotor endógeno deste gene por um promotor induzível modulado por cobre, para regular a expressão em *C. neoformans*. Após a construção deste cassete, $P_{CTR4-2}::P_{TRR1}$, foram selecionadas as linhagens após transformação genética de H99 e foram caracterizados os fenótipos pelos testes de viabilidade celular. Os dados demonstraram que *Trr1* participa da regulação de alguns dos fenótipos de virulência, e da resistência a vários estressores. Adicionalmente o tratamento de *C. neoformans* com as drogas antifúngicas comercialmente disponíveis e, com os compostos inibitórios identificados pela varredura virtual, mostraram ligeiras diferenças na atividade inibitória quando a expressão de *TRR1* foi suprimida. Assim, os resultados preliminares de *TRR1* demonstram a essencialidade deste gene no crescimento *in vitro*, que confirmam *Trr1* como uma enzima alvo potencial para pesquisa de novos fármacos contra o fungo patogênico *C. neoformans*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas linhagens tipo selvagem de *C. neoformans* variedade grubii H99 (CNA3) sorotipo A. Para a replicação dos plasmídeos com os insertos foram utilizadas as células competentes de *E. coli* XL10-Gold, e DH5a.

3.1 Meios de cultura

- Para a manutenção de *C. neoformans*, Meio YPD (*yeast extract-peptone-dextrose*): Extrato de levedura 1%, D-Glicose 2%, Peptona 2%, Ágar 2%, pH 5,6 -Autoclavagem a 120 °C por 15 min.
- YNB: Base nitrogenada para levedura com aminoácidos, dissolvido em água *Milli-Q*, esterilizado por filtração com membrana Millipore 0,22 µm.
- Meio mínimo (MM): D-Glicose 15 mM, MgSO₄ 10 mM, K₂HPO₄ 29,4 mM, Glicina 13 mM e Tiamina 3 µM, e Ágar 2%. pH 5,5 -Autoclavagem a 120 °C por 15 min.
- Meio de cultura utilizado para crescimento de *E. coli*: meio Luria-Bertani (LB): extrato de levedura 0,5%, Peptona 1%, NaCl 1% e ágar 1,5%. pH 7,2 – Autoclavagem a 120 °C por 20 min.

3.2 Construções dos cassetes de DNA e protocolo de transformação genética.

Todos os experimentos realizados para a construção e confirmação dos cassetes de DNA e co-transformação das linhagens em *C. neoformans*, foram orientados pela Dra. Larissa Matos, da Faculdade de Ceilândia, da Universidade de Brasília e pela Dra. Alessandra Dantas, da Universidade de Newcastle, Reino Unido.

3.2.1 Construção do cassete Hyg/P_{CTR4-2}

A PCR *Overlap* foi realizada para criar o plasmídeo Hyg/P_{CTR4-2}. O promotor regulado por cobre P_{CTR4-2} foi amplificado do plasmídeo NEO23 gentilmente cedido pelo prof. John Perfect, Universidade de Duke nos EUA), com os oligonucleotídeos 5+6 (LF451 e LF452).

Em resumo, o cassete de resistência a Hygromicina B (HPH) de 2013 pb foi amplificado a partir do plasmídeo pZPHYG usando os primers 3+4 (LF364 e LF450). Este cassete contém o gene HPH controlado pelo promotor de actina e terminador de TrpC, ambos de *C. neoformans*.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio, em seguida purificados com o kit GFX PCR DNA and Gel band purification Kit (GE

Healthcare) e quantificados. Os oligonucleotídeos LF364 e LF452 (3+6) foram usados para a realização da PCR de sobreposição (Davidson *et al.*, 2002) com a finalidade de fundir HPH ao P_{CTR4-2}.

Para a amplificação dos fragmentos iniciais foi utilizada a enzima *One taq DNA polymerase* (New England Biolabs), a partir da qual foi preparado um mix contendo 1U da enzima; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo; 0,2 mM de dNTP's; 1 X de tampão, 20 ng de DNA e quantidade de água *milliQ* para completar 25 µL. Os ciclos da PCR foram: pré-desnaturação de 30 sec. a 94 °C; amplificação em 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 sec, anelamento de 58 °C por 1 min e extensão final de 68 °C por 2 min:10 sec. Para o PCR de sobreposição dos fragmentos flanqueadores pela junção 3+6, foi utilizada a *One-taq master mix* com aprox. 1 µL de cada fragmento (20 ng) gerado na primeira etapa. O inserto Hyg-P_{CTR4-2} foi posteriormente purificado e clonado no vetor pGEMTEasy (Promega). 3 µL da reação de ligação foram transformadas via choque térmico em células competentes da linhagem DH5α de *E. coli* e as colônias com plasmídios recombinantes foram selecionadas em meio LB adicionado de ampicilina (50 µg/mL), na presença de X-gal e IPTG. As colônias bacterianas brancas foram isoladas, cultivadas em meio LB contendo ampicilina e em seguida purificadas. Foram selecionados 10 clones que continham a construção PGEMT Easy + HYG/P_{CTR4-2} para serem digeridos com a enzima de restrição SphI-HF (5U), *overnight*, a 37 °C (**Figura 55**).

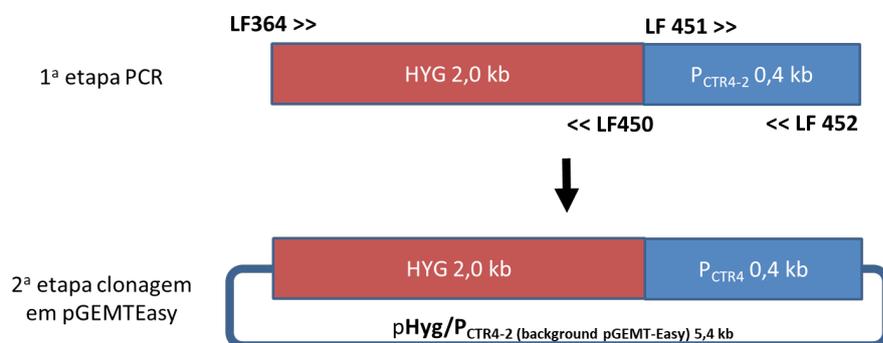


Figura 55. Procedimento da construção do cassete Hyg/P_{CTR4-2}

3.2.2 Construção do cassete para inserção do promotor P_{CTR4-2} usando PCR *Double joint (DJ-PCR)*

A construção do cassete P_{CTR4-2}/TRR1 foi feita pela técnica de PCR da dupla junta (*Double Joint*) (Kim *et al.*, 2009). A seleção do gene *TRR1* foi realizada através do banco de dados disponível no *Broad Institute*, que identificou uma sequência codante de uma proteína de 371 aminoácidos correspondente à ORF CNAG_05847 de *C. neoformans* var. *Grubii* H99. Para que fosse possível a construção do cassete, os códons de iniciação e de terminação do gene foram definidos para delimitar a

região flanqueadora de cada gene, assim foram selecionados +1 kb acima da *TRRI* ORF 5'-UTR e abaixo da *TRRI* ORF 3'-UTR para desenhar os oligonucleotídios a serem usados.

O cassete do gene de resistência (HYG^{R}) e o promotor regulado por cobre ($\text{P}_{\text{CTR4-2}}$) foram inseridos por recombinação homóloga para regular o gene *TRRI* no *background* genético da cepa H99 tipo selvagem. Recentemente Kim e cols., modificaram o método de interrupção gênica usando um marcador de seleção dominante que tende a gerar uma maior frequência de integração dirigida. Os dois fragmentos foram amplificados contendo regiões homologas adjacentes à ORF de *TRRI*, fusionados ao marcador seletivo, e posteriormente foram co-transformados no fungo por biobalística (Kim *et al.*, 2009).

A construção da substituição do promotor do gene *TRRI* consistiu no desenho de oligonucleotídeos que geram extremidades de DNA sobrepostas entre os dois ou mais módulos, necessárias para gerar a fusão em uma reação de PCR convencional, utilizando a DNA polimerase. A **Tabela 14** no **ANEXO F**, exibe os oligonucleotídeos usados a fim de isolar os fragmentos de interesse.

O diagrama da **Figura 56** mostra o gene *TRRI*, e o promotor putativo em *C. neoformans* com a construção dos fragmentos de DNA. A reação de amplificação para obter o cassete $\text{P}_{\text{CTR4-2}}/\text{TRRI}$ foi realizada em três etapas. Na primeira etapa de PCR foi utilizada a enzima *OneTaq 2X master mix*; a reação foi iniciada a partir de uma mistura (mix) contendo 12,5 μL da enzima, 0,2 μM de cada oligonucleotídeo; 20 ng de DNA molde (DNA genômico de *C. neoformans* H99), para obtenção dos fragmentos 1 + 2 que corresponde à região flanqueadora 5' *TRRI-HygP*_{CTR4-2} e 7+8 que corresponde à região flanqueadora 3' *TRRI-HygP*_{CTR4-2}. O plasmídeo *Hyg/P*_{CTR4-2}, construído neste trabalho foi utilizado como molde para a amplificação dos fragmentos 3+4 que corresponde à região 5' do marcador seletivo e 5+6 cujo fragmento corresponde à região 3' de *Hyg/P*_{CTR4-2}. O mix foi finalizado utilizando água *milliQ* suficiente para o volume total de 25 μL . Nessa etapa, os oligonucleotídeos empregados foram LF366 e LF367 para o fragmento 1+2; LF364 e LF28 para o fragmento 5' de *HygP*_{CTR4-2}; LF29 e LF452 para o fragmento 3' de *HygP*_{CTR4-2}; LF481 e LF453 para o fragmento 7+8 (**Figura 56**). O ciclo utilizado para as reações foi: um ciclo de 94 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 sec, 58 °C por 1 min, 68 °C por 1-2 min (extensão), e um ciclo de 68 °C por 5 min e 4 °C até o término da reação. Após o término da PCR, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% a fim de conferir os tamanhos esperados. Em seguida os fragmentos foram purificados com o Kit *GFX PCR DNA and Gel band purification Kit* (GE Healthcare) e quantificados.

Para a segunda etapa, foram fusionados os fragmentos 1+2 com 3+4 (PCR da dupla junta 1+4), equivalente à região flanqueadora 5' de *TRR1* fusionada à região 5' do marcador seletivo *Hyg*. O segundo fragmento sintetizado utilizando os fragmentos 5+6 com 7+8 (PCR da dupla junta 5+8), equivalente a região flanqueadora 3' de *TRR1* fusionada à região 3' do marcador seletivo *Hyg-P_{CTR4-2}*. Os tamanhos dos amplicons foram confirmados em gel de agarose 1% e purificados. Para a amplificação dos fragmentos citados acima foram utilizados os oligonucleotídeos LF366 e LF28 para amplificar o fragmento 1+4; LF29 e LF453 para amplificar o fragmento 5+8. As reações da segunda etapa da PCR *Double Joint* foram realizadas com a enzima *MM long Amp* (Biolabs), utilizando os seguintes componentes para cada reação: 25 µL da enzima (2x), 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 20 ng de cada fragmento de DNA e água *milliQ* até o volume final de 50 µL. O ciclo ocorreu da seguinte forma: um ciclo inicial de 94 °C por 1 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 sec, 58 °C – 60 °C por 1 min, 65 °C por 2 min, um ciclo final de 65 °C por 10 min e 4°C até o término da reação. Na terceira etapa, os 2 fragmentos purificados foram quantificados para posterior transformação por biobalística em células leveduriformes de *C. neoformans*.

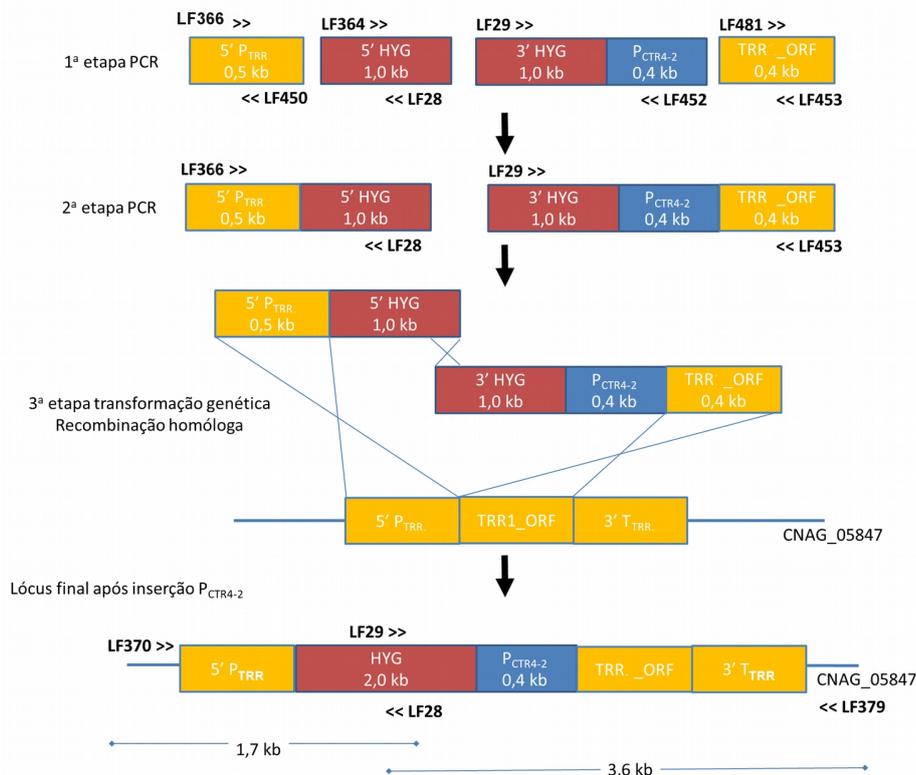


Figura 56. Esquema representativo da estratégia para construção dos cassetes contendo o Promotor CTR4. Os oligonucleotídeos 1 e 2 têm como alvo a região 5' adjacente ao gene alvo, e os oligonucleotídeos 7 e 8 que amplificam a região 3' do mesmo gene. As regiões 5' e 3' de *Hyg-P_{CTR4-2}* foram amplificadas usando os pares 3 e 4 e 5 e 6, respectivamente. Fusão dos fragmentos 5' do gene alvo com 5' de *Hyg*, e 3' do gene alvo com

3' de Hyg-P_{CTR4-2}, utilizando os primers 1 e 4 e 5 e 8. Os dois fragmentos gerados foram co-transformados em leveduras de *C. neoformans*.

3.2.3 Transformação de *C. neoformans* por biobalística

Colônias isoladas de *C. neoformans* da linhagem H99 foram inoculadas em 50 mL de meio YPD líquido, que cresceram sobre agitação de 150 rpm a 30 °C. Após 48 h as células foram lavadas em solução salina (NaCl 0,9%) por 5 min a 5000 rpm e transferidas para placas contendo meio ágar YPD + sorbitol 1 M para serem transformadas (Toffaletti *et al.*, 1993).

As partículas carregadoras do DNA de tungstênio M10, diâmetro 0,7 µm (Biorad) foram preparadas da seguinte forma: 1. *Esterilização das partículas*: a 30 mg de partículas adicionou-se 1 mL de etanol 70%, a mistura foi agitada em vórtex por 20 min a velocidade máx. Posteriormente as partículas foram centrifugadas a velocidade máx. por 10 min. Em seguida o sobrenadante foi removido e adicionou-se 1 mL de água *milliQ* estéril. O precipitado foi ressuspensionado e centrifugado a 13000 rpm por 10 min, o processo de lavagem das partículas foi repetido duas vezes. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e as partículas ressuspensionadas em 500 µL de glicerol 50% estéril. 2. *Precipitação do DNA a ser transformado nas partículas*: as partículas estéreis foram sonicadas por 7 min para que desgrumassem e depois foram agitadas a velocidade máx. em vórtex por 2 min. Posteriormente foram misturados na seguinte ordem: 50 µL de partículas estéreis, 5 µL de DNA (quantidade variou de 0,5 a 2 µg), 50 µL de CaCl₂ (2,5 M) estéril, 20 µL de espermidina (0,1 M, Sigma) estéril. A mistura foi imediatamente agitada em vórtex por 10 min, e então centrifugada por 10 sec. a velocidade máx. O sobrenadante foi descartado e as partículas foram ressuspensionadas em 150 µL de etanol absoluto. Centrifugou-se por 10 sec. à velocidade máx. e processo que foi repetido mais duas vezes. Na última lavagem foi adicionado uma quantidade de etanol absoluto proporcional ao número de placas a serem transformadas (4 µL para cada placa). As partículas foram sonicadas por 3 sec. e 4 µL foram imediatamente distribuídos nas membranas nos discos carregadoras estéreis e em seguida, foram incubados em sílica, onde permaneceram por pelo menos 30 min até o momento do bombardeamento.

Após 48 h foi feita a passagem das células bombardeadas para o meio seletivo, Higromicina B (200 µg/mL Invitrogen) suplementado com BCS 200 µM. Após incubação a 30 °C por 48 h, os transformantes foram repicados em meio YPD com meio seletivo suplementado com BCS (200 µM), um agente quelante específico de cobre (batocuproinadisulfonato sódico) e em meio seletivo suplementado com CuSO₄ (25 µM) para confirmação das colônias que cresceram somente no meio que

continha BCS. O DNA genômico dos possíveis transformantes foi extraído conforme protocolo para posterior confirmação via PCR.

3.2.4 Extração de DNA genômico de *C. neoformans* (Smash & Grab)

Para a extração do DNA genômico de *C. neoformans*, células foram cultivadas durante 48 h em 5 mL de meio YPD líquido a 30 °C. Após a incubação, as células foram centrifugadas por 5 min a 4000 rpm. O precipitado foi ressuscitado em 1,5 mL de água estéril e centrifugado à velocidade máx. durante 5 min; após descartar o sobrenadante foi adicionado 0,5 mL de fenol:clorofórmio (Bioagency), 0,5 mL de tampão TENTs (10 mM de Tris HCl, pH 7.5, 1 mM de EDTA, pH 8.0, 100 mM de NaCl, 2% de Triton X-100 e 1% de SDS) e pérolas de vidro (diâmetro:400-600 µm, Sigma). A mistura foi agitada em vórtex por 10 min e em seguida submetidos à centrifugação por 5 min a velocidade máx. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde foram adicionados 50 µL de acetato de sódio 3 M e 1 mL de etanol absoluto a fim de precipitar o DNA. O tubo foi agitado e centrifugado em velocidade máx. por 5 min e em seguida o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 200 µL de etanol 70% (vol/vol) e agitou-se novamente antes de centrifugar por 5 min à velocidade máx. Em seguida, o excesso de álcool foi removido e os tubos foram secados a temperatura ambiente por 5 min no fluxo laminar. O precipitado foi ressuscitado em 40 µL água ultrapura, acrescida de RNase A (150 µg/mL) e incubou-se os tubos a 37 °C por 1 h; depois o DNA foi armazenado em freezer (-20°C).

3.2.5 Confirmação P_{CTR4-2} :TRR1 por PCR

Após transformação por biobalística, as colônias que cresceram no meio suplementado com BCS e não com CuSO₄ foram inoculadas em meio LB líquido para extração do DNA com o auxílio do kit *Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare) conforme as instruções do fabricante. Um total de 9 clones foram escolhidos para a confirmação da inserção do cassete. Para a confirmação do cassete P_{CTR4-2} /TRR1, foi utilizada a enzima *LongAmp 2X MM*, com os oligonucleotídeos LF370 e LF379, conforme a **Tabela 14**, no **anexo F**. O ciclo ocorreu da seguinte forma: um ciclo inicial de 94 °C por 1 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 54 °C por 1 min, 65 °C por 5 min, um ciclo final de 65 °C por 10 min e 4 °C até o término da reação.

3.2.6 Construção do cassete TRR1-mCherry usando PCR Double Joint (DJ-PCR)

Para a construção do cassete para fusão da proteína TRR1 com mCherry foi utilizado o plasmídeo pCN51 (mCherry_Nat^r Amp^R), gentilmente cedido pelo Dr. Andrew Alspaugh, e que contém a marca de seleção de Nat^r e o marcador fluorescente mCherry.

Os detalhes da técnica de *DJ-PCR* foram descritos por Kim *et al.*, (2009) e Yu *et al.*, (2004), e a versão apresentada aqui é similar à relatada por esses autores. A reação de amplificação foi realizada em três etapas (**Figura 57**). Na primeira etapa de PCR foi utilizada a enzima *Phusion HsII* de alta fidelidade 2 U (Thermo Scientific); a reação foi iniciada a partir de um mix contendo 0,2 µM de cada oligonucleotídeo; 20 ng de DNA molde (DNA genômico de *C. neoformans*), 0,2 mM de dNTPs e tampão buffer HF ou GC 1X dependendo da reação de PCR, para obtenção dos fragmentos 1+2 que corresponde à região flanqueadora 5' de *TRR1_ORF-mCherry* e 7+8 que corresponde à região flanqueadora *TRR13'UTR-mCherry*. O plasmídeo pCN51 foi utilizado como molde para a amplificação dos fragmentos 3+4 que corresponde à região do marcador seletivo mCherry-3'Nat e 5+6 cujo fragmento corresponde à região 5'Nat. A mistura (mix) foi finalizada utilizando água *milliQ* suficiente para o volume total de 50 µL.

Nessa etapa, os oligonucleotídeos utilizados foram LF375 e LF376 para o fragmento 1+2; LF371 e LF372 para o fragmento 3+4; LF373 e LF374 para o fragmento 5+6; e LF377 e LF378 para o fragmento 7+8 (**Figura 57A**). O ciclo utilizado para as reações foi: uma etapa inicial de 98 °C por 1 min, seguida de 45 ciclos de 98 °C por 30 sec, 51 °C por 10 sec, 72 °C por 2 min, um ciclo final de 72 °C por 10 min, e 4 °C até o término da reação. Após o término da PCR, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% a fim de conferir os tamanhos esperado. Em seguida os fragmentos foram purificados e quantificados.

Para a segunda etapa, foram fusionados os fragmentos 1+2 com 3+4, equivalente à região flanqueadora 5' *TRR1_ORF* fusionada à região do marcador seletivo mCherry-3'Nat. O segundo fragmento foi sintetizado utilizando os fragmentos 5+6 com 7+8, equivalente a região flanqueadora de *TRR13'UTR* fusionada à região 5' do marcador seletivo mCherry-Nat. Os tamanhos dos amplicons foram confirmados em gel de agarose 1% e purificados. Para a amplificação dos fragmentos foram utilizados os oligonucleotídeos LF375 e LF372 para amplificar o fragmento 1+4; LF373 e LF378 para amplificar o fragmento 5+8 (**Figura 57B**). As reações da segunda etapa do PCR *Double Joint* foram realizadas com a enzima *Phusion HsII* de alta fidelidade, utilizando os seguintes componentes para cada reação: 2 U da enzima, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de dNTPs, 20 ng de cada fragmento de DNA, tampão buffer 1X (HF para amplificar o fragmento 1+4 e GC para amplificar o fragmento 5+8), e água *milliQ* até o volume final de 50 µL. O ciclo ocorreu da seguinte forma: um ciclo inicial de 98 °C por 30 sec, seguido de 45 ciclos de 98 °C por 30 sec, 51 °C por 10 sec, 72 °C por 2 min, um ciclo final de 72 °C por 10 min e 4 °C até o término da reação. Os fragmentos purificados

foram quantificados para posterior transformação por biobalística em células leveduriformes de *C. neoformans* (**Figura 57C**).

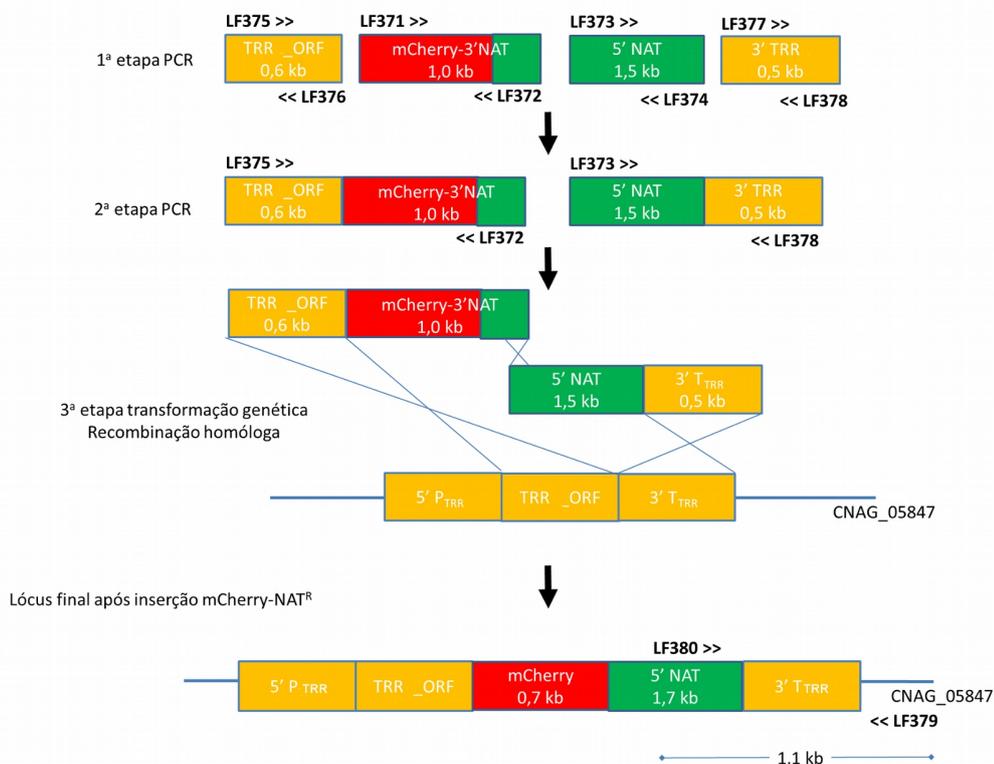


Figura 57. Procedimento geral da técnica PCR *Double Joint* para construção do cassete TRR1-mCherry. (A) Os oligonucleotídeos 1 e 2 têm como alvo a região 5'adjacente ao gene alvo, e os oligonucleotídeos 7 e 8 que amplificam a região 3' do mesmo gene. As regiões 5'e 3'de mCherry-Nat foram amplificadas usando os pares 3 e 4 e 5 e 6, respectivamente. (B) Fusão dos fragmentos 5' do gene alvo com 5'de mCherry-Nat e 3' do gene alvo com 5' Nat, utilizando os primers 1 e 4 e 5 e 8. (C) Os dois fragmentos gerados (1+4 e 5+8) foram co-transformados em leveduras de *C. neoformans*.

3.2.7 Confirmação da integração do cassete TRR1-mCherry no genoma por PCR

Para verificar se o fragmento com a marca de seleção Nourseotricina e mCherry foi integrado no locus de *TRR1*, após transformação por biobalística, foram utilizados oligonucleotídeos, sendo um desenhado externamente à região de *TRR1* e outro que reconhece a região mCherry-Nat, conforme a **Tabela 14**, no **anexo F**. Para a amplificação foi usada a enzima PyroStartTM Fast PCR Master Mix (2X) (Fermentas Life Science), 0,5 μM de cada oligonucleotídeo LF379 e LF380, para completar a reação foram utilizados 10 ng de DNA extraído de 5 transformantes escolhidos aleatoriamente após a seleção na marca de seleção Nat^r e água ultrapura para completar o volume final de 25 μL. O ciclo utilizado

para esta reação foi: um ciclo de 95 °C por 1 min, 35 ciclos de 95 °C por 10 sec, 50 °C por 10 sec, 68 °C por 1 min, um ciclo final de 68 °C por 25 sec, e 4 °C até o término da reação.

3.2.8 Confirmação da integração do cassete *TRR1-mCherry-NAT^R* por *Southern Blot*

Para a análise por *Southern Blot* o DNA genômico de 5 transformantes (2, 4, 16, 36 e 48) mais o isolado selvagem H99 foram quantificados e diluídos para a concentração de 15 µg/µL, sendo utilizados 30 µL de DNA para cada digestão. A enzima de restrição selecionada foi KpnI (New England Biolabs) a 10 U/µL, e as reações de digestão foram conduzidas conforme as instruções do fabricante.

A reação de restrição utilizando KpnI foi realizada para um volume de 40 µL, contendo 15 µg de DNA, 4 µL de tampão NEB1 10X, 0,4 µL de BSA 100X, 3 µL de enzima e 2,6 µL de água *milliQ* para completar o volume final. Após a digestão do gDNA com a enzima de restrição, foi realizada a transferência do gDNA para a membrana de Nylon (Hybond N+, GE) por meio de um sistema de transferência por capilaridade. Utilizou-se a solução de transferência SSC 20X (Citrato de sódio dihidratado 0,3 M, Cloreto de sódio 3 M, pH 7). No dia seguinte foi realizado o “*cross-linking*” para fixação do DNA à membrana. Para a hibridação da membrana, foi utilizado o protocolo do Kit *DIG Wash and Block Buffer Set* (Roche).

A reação de PCR da sonda para incorporação do marcador DIG (dioxigenina) foi usado como molde o DNA genômico H99 (20 ng), utilizou o kit *PCR DIG Probe Synthesis Kit* (Roche) com os oligonucleotídeos LF375 e LF378 (0,2 µM), tampão Buffer 5X, dNTPs 1X, PCR dig probe Mix 2X (1:2) e a enzima One taq Polimerase (5 U) em um volume de 25 µL complementado com água ultrapura. O ciclo utilizado foi constituído de: um ciclo inicial de 94 °C por 1 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 sec, 56 °C por 30 sec, 68 °C por 1 min 10 sec, um ciclo final de 68 °C por 5 minutos, e 4 °C até o término da reação. Após hibridização, a solução foi retirada e a membrana foi lavada. Com o auxílio do *DIG Wash and Block Buffer Set* (Roche) foram feitos o preparo e bloqueio da membrana. O processo de revelação foi realizado em ausência de luz, com exceção de uma luz infravermelha como única fonte de iluminação.

3.3. Determinação do crescimento celular do mutante condicional *P_{CTR4-2}/TRR1*.

A cepas *PCTR4-2/TRR1* de *C. neoformans* e o H99 foram crescidas a 30 °C em YPD agar contendo BCS. As células foram centrifugadas e lavadas com salina estéril 0,9% e ressuspensas em salina com diluições em seriadas 1:10. Um total de 5 µL de cada diluição (10⁷ - 10² células) foram

plaqueadas em YPD agar contendo BCS 200 μM ou CuSO_4 (30, 60 e 120 μM). As cepas criptococócicas foram incubadas a 30 °C e 37 °C por 48 h.

3.3.1 Curvas de crescimento

As cepas H99 e $P_{CTR4-2}/TRR1$ foram cultivadas a 30 °C em meio YPD ou em meio mínimo (YNB) contendo BCS ou CuSO_4 . As células foram lavadas em solução salina, e foram contadas na câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada a uma densidade de 10^5 células/mL. As placas foram incubadas no equipamento *Eon Biotek* com agitação e a cada 30 min, a absorbância 595 nm foi medida ao longo de 72 h. As contagens quantitativas das células de levedura foram realizadas em culturas de células de levedura diluídas em 100 μL em ágar YPD-BCS. As contagens quantitativas para o UFC foram feitas em placas contendo ágar YPD-BCS e foram avaliadas aos 0, 6, 12, 24, 48 e 72 h após a cultura. O procedimento foi feito em duplicata.

3.3.2 Avaliação fenotípica in vitro

As cepas $P_{CTR4-2}/TRR1$ e H99 foram crescidas previamente em meio YPD a 30 °C por 48 h, em seguida centrifugadas (3000 $\times g$ /4 min/temperatura ambiente) e lavadas com solução salina (0,9%) e ressuspensas em 1 mL da mesma solução. Os inóculos foram então diluídos 1:100 e contados em Câmara de Neubauer. Foi estabelecida uma concentração padrão inicial de 1×10^7 células/mL. A partir da concentração inicial foram realizadas diluições seriadas. Os testes dos fenótipos em condições de estresse oxidativo e osmótico foram realizados por meio de diluição seriada, plaqueando-se *spots* de ~ 5 μL de cada uma das diluições. Para o teste de produção de cápsula, foi utilizada uma única diluição.

Estresse térmico

As leveduras foram plaqueadas em meio YPD sólido e YNB sólido (com a adição ou não de BCS ou cobre), em conjunto com a linhagem selvagem para controle e incubadas a 30 °C e 37 °C por 48 -120 h.

Estresse oxidativo

O efeito de agente oxidativo sobre as cepas $P_{CTR4-2}/TRR1$ e a selvagem, foi testado em meio YPD e meio mínimo (com BCS ou cobre), suplementados com H_2O_2 , nas concentrações de: 1 mM e 2 mM. O teste também foi feito com menadiona nas concentrações de: 0,01 mM e 0,02 mM. As placas foram incubadas a 30 °C por 48-120 h.

Estresse osmótico

O efeito de agentes osmóticos sobre $P_{CTR4-2}/TRR1$ e a cepa selvagem, foi testado em meio YPD (com BCS ou cobre) suplementado com KCl 1,5 M e Sorbitol 2,5 M. Em ambos os testes as placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h.

Indução de capsula

A produção de cápsula foi avaliada para cada linhagem ($P_{CTR4}/TRR1$ e H99), previamente crescida em meio YPD durante à noite a 30° C com rotação a 180 rpm. Em seguida as células foram lavadas em salina 3x e a densidade celular foi ajustada a 10^5 células/mL em meio mínimo (MM) quimicamente definido, com a adição de 25 µM de cobre para inibir a expressão do gene. Um volume de 5 mL da suspensão celular foi inoculado em Erlenmeyer de 50 mL e então incubado a 30 °C /180 rpm por 24 h. Posteriormente foi realizada a visualização microscópica com tinta nanquim. Utilizou-se o microscópio *Zeiss Axio Observer Z1*. Para calcular o tamanho da cápsula, foi medida a dimensão total da célula (corpo da célula + cápsula) e do corpo celular (região delimitada pela parede celular) usando-se o programa *Fiji (Image J)*. O tamanho da cápsula foi definido como a diferença entre o diâmetro total das células menos o diâmetro do corpo celular. No mínimo 180 células foram contadas para cada grupo. Os dados obtidos a partir da razão $P_{CTR4}/TRR1$ / tipo selvagem foram empregados para quantificação relativa e análise estatística. As análises estatísticas foram feitas através do Software Graphpad Prism utilizando a comparação *one-way* Anova.

Síntese de melanina

A produção de melanina foi avaliada em um inóculo contendo 1×10^6 células/mL, das leveduras selvagem e as $P_{CTR4}/TRR1$ em meio mínimo suplementado com L-DOPA 1 mM (Sigma-Aldrich) em presença de BCS ou cobre. Em placa de 24 poços foi adicionado 1 mL da suspensão de células, então as placas foram incubadas a 30 °C/150 rpm protegidas da luz e incubadas até 3 dias. As placas foram monitoradas diariamente no intuito de acompanhar a produção do pigmento escuro correspondente a produção de melanina.

3.3.3 Determinação da atividade dos agentes antifúngicos.

Os testes de susceptibilidade das drogas antifúngicas e moléculas inibitórias foram realizados em YPD+BCS e YPD+CuSO₄, contendo a concentração da droga de interesse: 4 µg/mL de fluconazol, 64 e 32 µg/mL do composto 3 e 16 µg/mL do composto 14 Os inóculos foram diluídos de forma a ter

concentrações de 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 células/mL e então foram plaqueadas alíquotas de 5 μ L de cada um. As placas foram incubadas a 30 °C até que se visualizasse o crescimento das colônias.

Para testar a atividade das potenciais moléculas inibidoras de Trt1 selecionadas previamente pela varredura virtual, um total de 1×10^5 células de cepas de *C. neoformans* H99 e $P_{CTR4-2}/TRR1$ foram crescidos a 30 °C em YPD líquido e YNB, contendo BCS ou CuSO_4 com e sem as drogas, com as seguintes concentrações: fluconazol: 4 $\mu\text{g/mL}$, Mol_3: 32 $\mu\text{g/mL}$ e Mol_14: 8 $\mu\text{g/mL}$. A contagem das colônias foi realizada plaqueando alíquotas de 100 μL em ágar YPD-BCS após 0, 6, 12, 24, 48 e 72 h de exposição.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Confirmação da construção Hyg/P_{CTR4-2} por PCR *overlapping*

O plasmídeo NEO23 foi transformado em células competentes XL10-Gold e utilizado para amplificação do P_{CTR4-2}, com os oligonucleotídeos LF451 e LF452, sendo o tamanho esperado para essa região de 432 pb (**Figura 58A**).

O cassete *HYG* foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo pPZPHYG usando-se os oligonucleotídeos LF364 e LF450. O tamanho esperado para essa região foi de 2.013 pb (**Figura 58B**). Assim, o cassete *HYG*/P_{CTR4-2} correspondente a um fragmento final de 2.445 pb foi amplificado a partir dos oligonucleotídeos LF364 e LF452 (**Figura 58C**). Este fragmento foi clonado em pGEMT Easy, transformado em *E. coli* e nomeado de p*HYG*/P_{CTR4-2} para uso como molde na etapa seguinte.

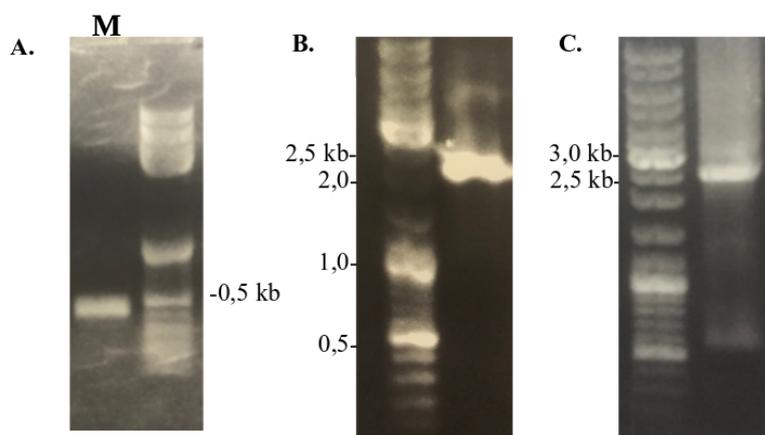


Figura 58. Construção do cassete Hyg/P_{CTR4-2} por PCR. (A) Produto de 432 pb da amplificação do P_{CTR4-2}. (B) Produto de 2.013 pb da amplificação do cassete HYG. (C) PCR overlap do cassete Hyg/P_{CTR4-2} amplificando um fragmento de 2.445 pb. M, marcador de peso molecular 1 kb.

4.2 Construção de cassete contendo o gene *TRR1* sobre o controle do promotor induzível P_{CTR4-2} em *C. neoformans*

A PCR *Double Joint* consistiu em duas etapas descritas na metodologia. Os tamanhos dos produtos da reação gerados na primeira etapa foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1% como mostrado na **Figura 59**. Para a obtenção dos fragmentos 1+2 e 7+8 foi utilizado o DNA genômico da cepa H99, já para a amplificação dos fragmentos 3+4 e 5+6 o plasmídeo Hyg/P_{CTR4-2} foi usado como molde. Os oligonucleotídeos utilizados foram LF366 e LF367 para o fragmento 1+2 (544 pb); LF364 e LF28 para amplificar o fragmento 5'Hyg/P_{CTR4-2} (3+4: 1057 pb); LF29 e LF452 para amplificar o fragmento 3'Hyg/P_{CTR4-2} (5+6: 1591 pb) e LF481 e LF453 para o fragmento 7+8 (407 pb).

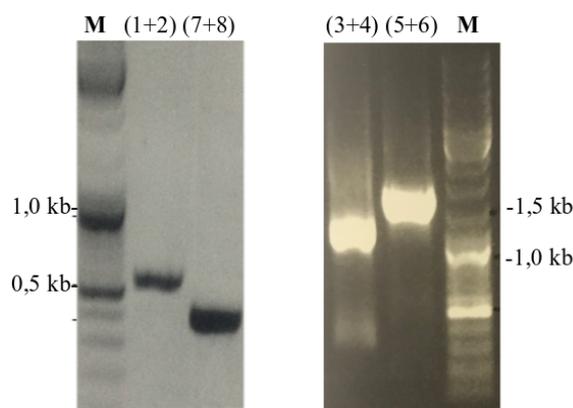


Figura 59. Confirmação dos produtos obtidos na primeira etapa da técnica de *PCR Double Joint* que consistiu na amplificação de 4 fragmentos: 2 fragmentos da marca de seleção e 2 fragmentos adjacentes ao gene alvo. Fragmento 1+2 = 544 pb, 5' *TRR1*. Fragmento 7+8 = 407 pb 3' *TRR1_ORFterm*. Fragmento 3+4 = 1.057 pb 5' Hyg/*P_{CTR4-2}*. Fragmento 5+6 = 1.591 pb 3' Hyg/*P_{CTR4-2}*. M, Marcador de peso molecular 1 kb.

A confirmação dos produtos obtidos na segunda etapa da técnica de *PCR Double Joint* que consiste na fusão dos fragmentos adjacentes ao gene alvo *TRR1* com os fragmentos da marca de seleção Hyg/*P_{CTR4-2}*, foi realizada com as seguintes combinações de oligonucleotídeos: LF366 e LF28 para gerar o fragmento 5' (gene 5'*TRR1* + 5'Hyg) e LF29 e LF453 para gerar o fragmento 3' (3' Hyg/*P_{CTR4-2}* + gene 3'*TRR1_ORFTerm*). A fusão dos fragmentos 1+4 (PCR da dupla junta) resultou em um fragmento de 1.601 pb e o segundo fragmento 5+8 (PCR da dupla junta), resultou em 1.998 pb (**Figura 60**).

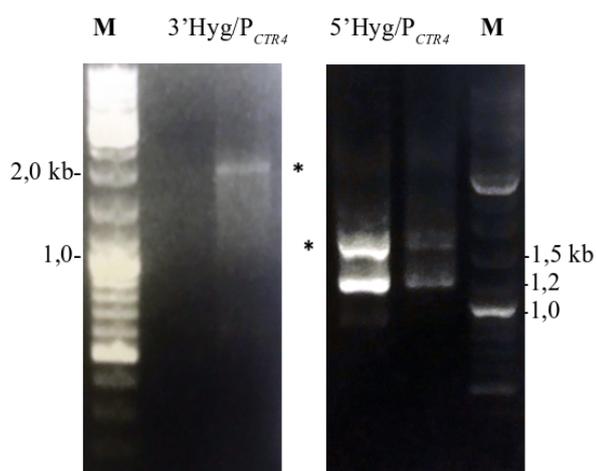


Figura 60. Confirmação dos produtos obtidos na segunda etapa da técnica de *PCR Double Joint*. O fragmento 3' do gene alvo com 3' de Hyg_*P_{CTR4-2}*, gerou uma banda de 1.998 pb, enquanto que o fragmento 5' Hyg gerou uma banda de 1.601 pb. M, Marcador de peso molecular 1 kb.

4.3 Confirmação dos mutantes *P_{CTR4}/TRR1*

Após a obtenção de transformantes estáveis de *C. neoformans* por biobalística contendo *P_{CTR4}::TRR1*, foi avaliada a recombinação homóloga para inserção de *P_{CTR4}* no locus de *TRR1*. 2 mutantes

confirmaram a recombinação homóloga e a inserção do promotor regulado por cobre. A PCR com os oligonucleotídeos LF370 e LF379 amplificou um fragmento de 5.224 pb na região que abrange o cassete integralmente, enquanto que a cepa selvagem H99 amplificou um fragmento de 2.775 pb (**Figura 61**).

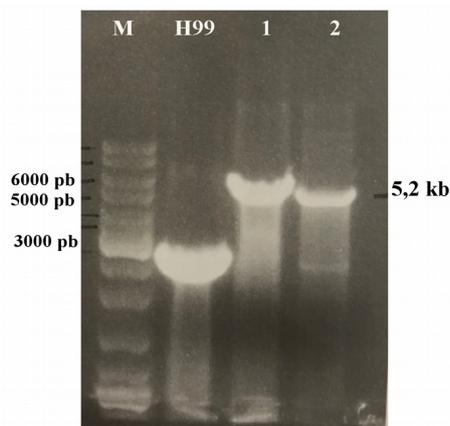


Figura 61. Confirmação da inserção do promotor P_{CTR4} em *C. neoformans*. O fragmento amplificado apresentou um tamanho aproximado de 5,2 Kb (clones 1 e 2). M, Marcador de peso molecular 1 kb.

4.4 Construção do cassete TRR1-mCherry por PCR *Double Joint*

O cassete contendo TRR1-mCherry foi construído e transformado no fungo patogênico *C. neoformans*. O cassete obtido pela técnica de PCR *Double Joint* consistiu em duas etapas de PCR. Na primeira etapa de PCR, para a obtenção dos fragmentos 1+2 e 7+8 utilizou-se como molde o DNA genômico da cepa H99 e os oligonucleotídeos LF371 e LF376, e LF377 e LF378, respectivamente; já para os fragmentos 3+4 e 5+6 foi usado o plasmídeo pCN51 como molde para a amplificação com a enzima *Phusion HsII* e os oligonucleotídeos utilizados foram LF371 e LF372, e LF373 e LF374, respectivamente (**Figura 62A**). Na segunda etapa de PCR, foram gerados os fragmentos 1+4 (PCR da dupla junta), equivalentes à região flanqueadora 5' TRR1-mCherry3'Nat fusionada à região 3' do marcador seletivo mCherrytagg_3'Nat, com os oligonucleotídeos LF375 e LF372. O segundo fragmento foi obtido fusionando os fragmentos 5+8 (PCR da dupla junta), equivalentes à região flanqueadora de 5'NatTRR13'UTR fusionada à região 5' do marcador seletivo Nat, com os oligonucleotídeos LF373 e LF378 (**Figura 62B**).

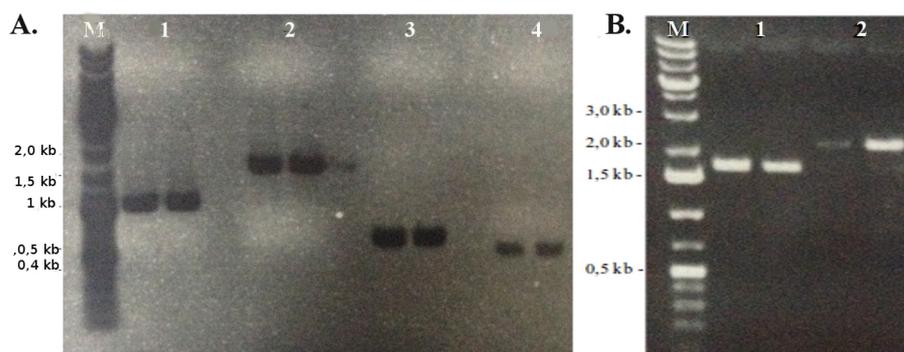


Figura 62. Confirmação dos produtos obtidos pela técnica de PCR *Double Joint* para construção do cassete contendo TRR1-mCherry. (A) a primeira etapa consistiu na amplificação de 4 fragmentos; 2 fragmentos da marca de seleção (a amplificação utilizou o plasmídeo pCN51 com a marcação da proteína fluorescente) e 2 fragmentos adjacentes ao gene alvo. 1. Fragmento 3+4 = 1.030 pb mCherrytagg_3'nat; 2. Fragmento 5+6 = 1.589 pb 5'nat; 3. Fragmento 1+2 = 592 pb 5' TRR1-mCherry; 4. Fragmento 7+8 = 480 pb 3'TRR1mCherry. (B) A segunda etapa que consistiu na fusão dos fragmentos adjacentes ao gene alvo com os fragmentos da marca de seleção. 1. Fragmento 1+4 = 1.622 pb correspondente a fusão 5'. 2. Fragmento 5+8 = 2.069 pb que correspondente a fusão 3'. M, Marcador de peso molecular 1 kb. Os dois fragmentos gerados foram co-transformados na levedura de *C. neoformans*.

Após a co-transformação na levedura de *C. neoformans* o fragmento integrado TRR1-mCherry_Nat, foi confirmado por PCR usando os oligonucleotídeos LF379 e LF380 que geraram um fragmento de 1.112 pb como esperado, quando foram amplificados com a enzima Pyrostar e com o DNA genômico extraído de 5 transformantes que cresceram em meio YPD crescido com a marca de seleção Nat^r (Figura 63).

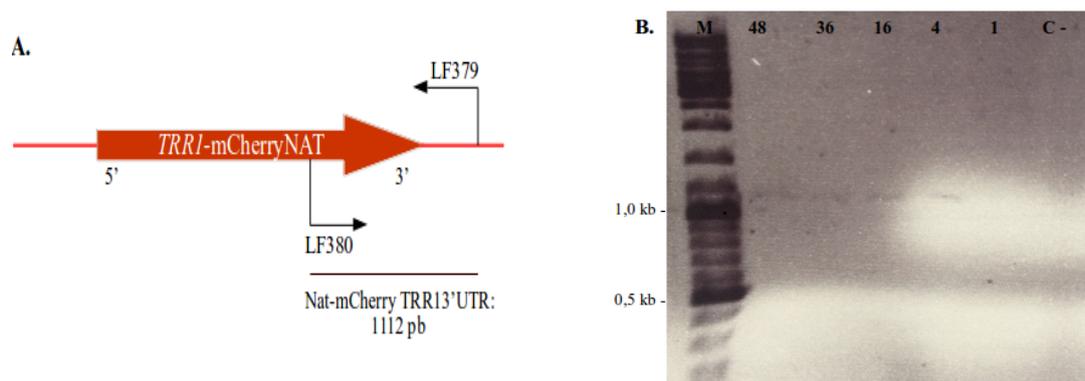


Figura 63. Confirmação dos transformantes TRR1-mCherry_Nat por PCR. (A) Esquema para a reação de confirmação dos transformantes em *C. neoformans* usando os oligonucleotídeos LF379 e LF380. (B) PCR de confirmação dos clones positivos que integraram o cassete no locus do gene *TRR1* (48, 36, 16 e 4), C-: controle negativo com o DNA genômico H99 (*untagged*) Os fragmentos amplificados apresentaram um tamanho de 1.112 pb. M, marcador de peso molecular 1 kb.

Após a PCR de confirmação, 5 transformantes TRR1-mCherry_Nat foram submetidos a *Southern Blot*. Na **Figura 64A** observa-se uma representação dos sítios da enzima de restrição KpnI no locus de *TRR1* com representação da sonda de 1.075 pb (amplificada com os oligonucleotídeos LF375 e LF378) e os tamanhos esperados após hibridização para a linhagem selvagem H99 de 874 pb ou 7.752 pb.

Já para a integração da proteína fluorescente mCherry os fragmentos gerados: 874 pb, 1.766 pb e 8.651 pb. A **Figura 64B** apresenta o perfil após hibridização e revelação do *Southern blot*, sendo possível notar um fragmento de tamanho esperado de ~8,6 kb para todos os possíveis transformantes TRR1-mCherry, porém não foram observados os outros dois fragmentos. Apesar da ausência de alguns fragmentos foi possível observar os dois fragmentos maiores de 7,7 kb e 8,6 kb para a linhagem selvagem (H99) e transformantes analisados, respectivamente, confirmando que a inserção do cassete ocorreu no locus do gene-alvo.

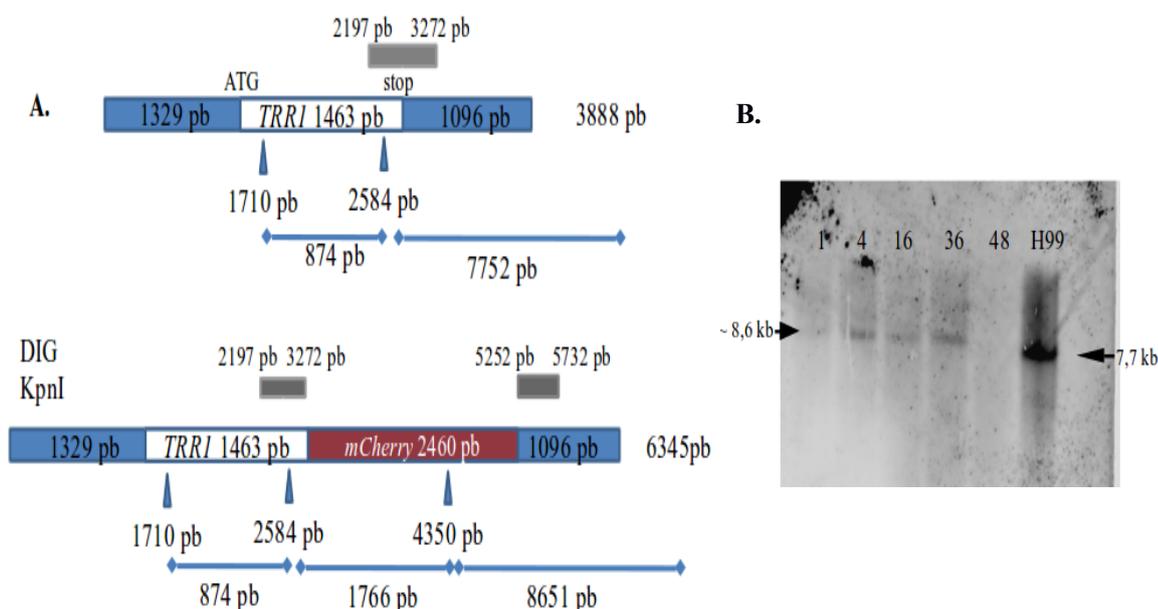


Figura 64. Southern Blot dos transformantes TRR1-mCherry confirmados por PCR. O DNA digerido foi transferido para membrana de nylon positivamente carregada e hibridizado com a sonda de 1.075 pb. **(A)** Esquema que representa o perfil de restrição para a localização do sítio da enzima KpnI no locus *TRR1-mCherry*. **(B)** Resultado do Southern Blot após hibridização com a sonda e digestão do DNA genômico de 4 clones positivos (1, 4, 16, 36). H99: cepa selvagem

Como visto na **Figura 65**, a célula que apresenta *Trr1* fusionada à proteína fluorescente mCherry, emite a coração vermelha, confirmando a correta inserção do cassete *TRR1-mCherry*. A co-

localização subcelular das células com marcadores organelares deverá ser realizada em experimentos futuros que determinarão a posição específica intracelular de Trr1 no fungo.

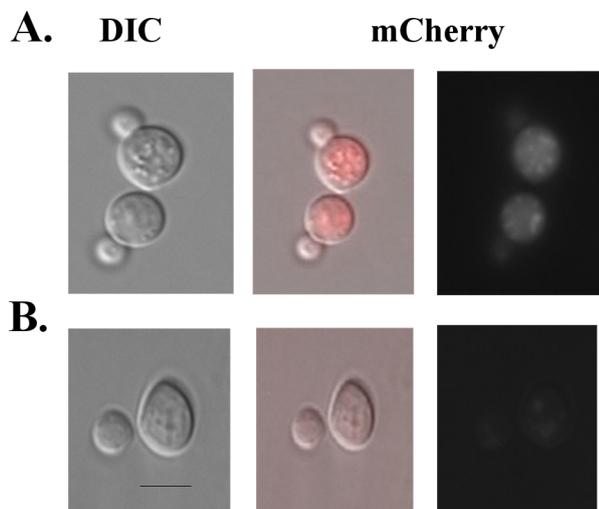


Figura 65. Microscopia de fluorescência utilizando a linhagem TRR1-mCherry em *C. neoformans*. (A) Expressão de TRR1-mCherry (B) Controle (H99) sem inserção de mCherry. Células visualizadas utilizando microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) e de fluorescência (mCherry). Barra de escala 10 μ m.

Vários estudos mostraram que o gene tioredoxina redutase é essencial para o crescimento de alguns organismos, como *P. falciparum* e *S. aureus* (Krnajski *et al.*, 2002; Uziel *et al.*, 2004). Em 2005 Missall e Lodge, relataram pela primeira vez que a *TRR1* é essencial no fungo patogênico *C. neoformans*. Uma vez que a sua estrutura é altamente conservada entre espécies e a maioria de microorganismos patogênicos codificam esta proteína, esta torna-se um excelente alvo para drogas.

4.5 Determinação do crescimento celular da cepa $P_{CTR4-2}/TRR1$

Usando o promotor do gene transportador de cobre *ctr4+* de *Schizosaccharomyces pombe*, Bellemare e cols., (2001) criaram uma série de vetores, denominados *pctr4⁺-X*, que regulam a expressão de genes heterólogos em função da disponibilidade de cobre. O gene *CTR4* codifica um transportador de cobre de alta afinidade em *S. pombe*. A transcrição do *CTR4* é regulada pela proteína de ligação ao DNA Cuf1p. Em condições de baixo teor de cobre, Cuf1p interage com elementos sensores de cobre (CuSE) *upstream* *CTR4*, aumentando consideravelmente a transcrição. Sob condições cheias de cobre, Cuf1p liga-se ao cobre e adota uma conformação com pouca ou nenhuma afinidade pelas CuSEs. Quando isso ocorre, a transcrição de *CTR4* é efetivamente reprimida (ANEXO G). Adicionalmente, o meio de crescimento ou fontes de carbono não são necessários para desligar ou

induzir a expressão do gene. Em 2004, Ory e cols., construíram plasmídeos de expressão incorporando elementos *upstream* do gene transportador de cobre CTR4 de *C. neoformans* (serotipos A e D). Em resposta à privação de cobre, esses plasmídeos medeiam o alto nível de expressão de uma proteína repórter.

Assim, para reduzir a expressão de *TRR1*, foi feita a substituição do promotor do gene tipo selvagem pelo promotor regulado por cobre (P_{CTR4-2}), que permitiu dar continuidade à caracterização dos fenótipos (viabilidade celular e resistência ao estresse oxidativo) na presença e ausência das drogas inibidoras selecionadas.

A linhagem contendo $P_{CTR4-2}::PTRR1$ foi então cultivada na presença de cobre para reduzir a expressão do gene *TRR1*. O crescimento celular foi determinado em ágar YPD com BCS, e CuSO_4 a 30 °C e 37 °C como mostrado na **Figura 66**. A 30 °C a cepa H99 de *C. neoformans* mostra crescimento normal em ágar YPD contendo BCS e em ágar YPD contendo CuSO_4 . A 37 °C embora as células de H99 foram mais sensíveis, conseguiram crescer normalmente após >96 h de incubação. Em contraste, as cepas mutantes mostram uma diminuição de crescimento em ágar YPD contendo CuSO_4 em ambas as temperaturas. Estes dados confirmam que o gene *TRR1* está sob controle do promotor CTR4.

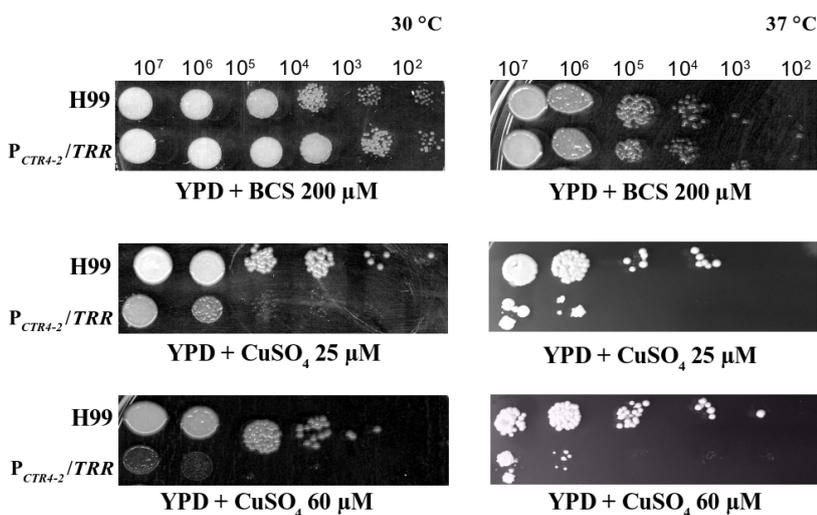


Figura 66. Determinação de crescimento das cepas H99 e $P_{CTR4-2}/TRR1$ em *C. neoformans* em ágar YPD contendo BCS e CuSO_4 a 30 °C (48-72 h de incubação) e 37 °C (> 96 h de incubação).

O crescimento celular também foi determinado em ágar YNB com BCS, e YNB com CuSO_4 a 30 °C e 37 °C como mostrado na **Figura 67**. No entanto o crescimento celular foi retardado e as células tiveram que ser incubadas por aproximadamente 9 dias.

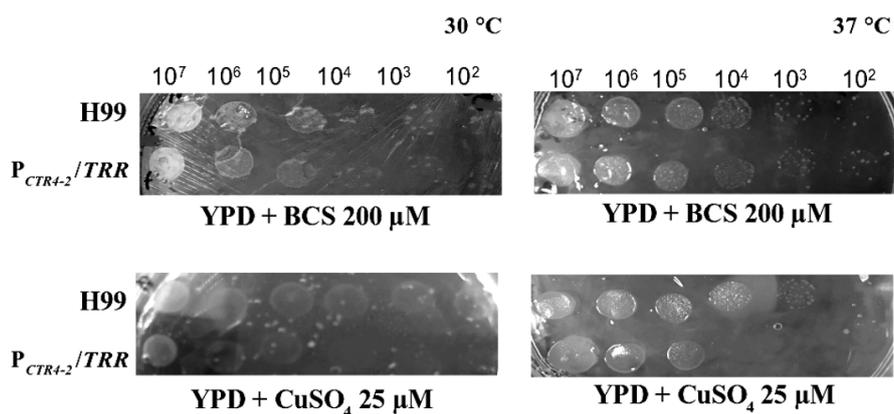


Figura 67. Determinação de crescimento das cepas H99 e P_{CTR4-2}/TRR1 em *C. neoformans* em ágar YNB contendo BCS e CuSO₄ incubadas a 30 °C e 37 °C por 9 dias.

4.6 Avaliação da susceptibilidade do mutante P_{CTR4-2}/TRR1 a vários agentes estressores

O painel abaixo mostra o perfil de crescimento da linhagem P_{CTR4-2}/TRR1 gerada neste estudo, sob condições de estresse oxidativo. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi adicionado ao meio ágar YPD-Cobre (25 μM) e demonstrou redução no crescimento de P_{CTR4-2}/TRR1 na concentração 2 mM, indicando que a cepa H99 é mais resistente do que P_{CTR4-2}/TRR1. A capacidade de lidar com o estressor oxidativo menadiona, também foi avaliada no mutante P_{CTR4-2}/TRR1 nas seguintes concentrações: 0,01 mM e 0,02 mM em células crescidas em meio YPD-BCS e Cobre a 30 °C, no entanto o tempo de incubação foi >72 h. Com a adição de menadiona foram detectadas diferenças mais acentuadas no crescimento ao comparar a linhagem P_{CTR4-2}/TRR1 e selvagem. Na concentração 0,01 mM de menadiona o crescimento do mutante P_{CTR4-2}/TRR1 se observa ainda mais afetado na presença de CuSO₄. Na concentração 0,02 mM ambas cepas são afetadas, mas o H99 consegue crescer até a primeira diluição (10⁷) enquanto que o P_{CTR4-2}/TRR1 não cresce (**Figura 68**). Uma vez que o meio YPD é um meio rico que poderia influenciar no crescimento celular, os ensaios foram conduzidos em meio mínimo para descartar que as diferenças são ocasionadas pelos compostos presentes no meio de crescimento. Em resposta ao crescimento em YNB, ambas as cepas foram mais sensíveis a esse meio de cultura, de modo que o tempo de crescimento foi em media 9 dias de incubação a 30 °C, indicando que o meio de cultura não influenciou o crescimento das cepas.

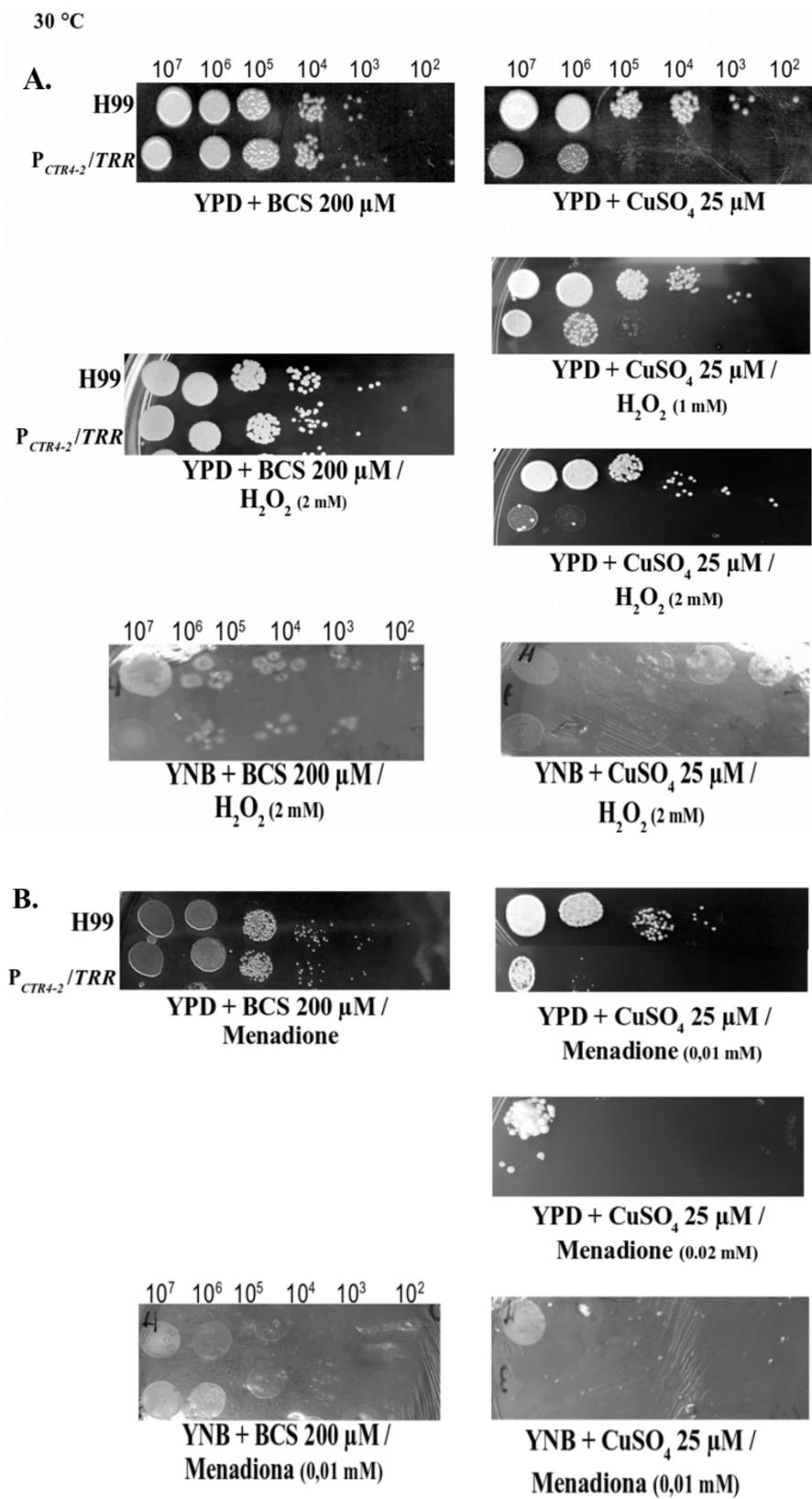


Figura 68. Análise da susceptibilidade ao estresse oxidativo causado por H₂O₂ e menadiona do mutante P_{CTR4-2}/TRR1 de *C. neoformans* em meio YPD e YNB a 30 °C. (A) As concentrações de H₂O₂ foram: 1 e 2 mM,

e **(B)** as concentrações de menadiona foram: 0,01 e 0,02 mM. As cepas crescidas em ágar YPD em presença de peróxido de hidrogênio foram incubadas por 48 h, enquanto que com menadiona as células foram incubadas por >72 h pelo fato das células crescerem mais lentamente. Em meio mínimo (YNB) o crescimento celular foi observado 9 dias depois.

Estudos em *S. cerevisiae* demonstraram que a deleção da tioredoxina redutase ou tioredoxina 1 e 2, pode resultar na diminuição da capacidade das células mutantes para detoxificar o agente H₂O₂ ou outros oxidantes. Mutantes $\Delta trr1$ em *S. cerevisiae* são extremamente sensíveis ao peróxido e a altas temperaturas (Machado *et al.*, 1997). Adicionalmente, embora a expressão das peroxidases dependentes de tioredoxina seja elevada, as enzimas não são capazes de remover peróxidos sem a redução previa pelo sistema tioredoxina (Carmel-Harel *et al.*, 2001). Em *S. cerevisiae*, o genoma codifica um sistema de tioredoxina mitocondrial completo, além do seu sistema citoplasmático (Pedrajas *et al.*, 1999), que poderia ajudar a explicar porque *Trr1* não é essencial em leveduras.

Sabe-se que o ambiente de redução da célula é mantido tanto pelo sistema tioredoxina quanto pelo sistema glutaredoxina. No entanto, em leveduras ao contrário das tioredoxinas, a perda de glutaredoxinas não afeta o ciclo celular, nem resulta em nenhum fenótipo de crescimento aberrante detectável. As cepas mutantes *GLR1*, que codificam para a glutatona redutase, são viáveis e não são afetadas pelo crescimento durante condições aeróbias (Grant *et al.*, 1996). *E. coli*, apresenta um sistema redox tiol alternativo que utiliza glutatona e glutaredoxina e pode efetivamente substituir a tioredoxina (Holmgren, 1985). Os mutantes de *E. coli* que não tem uma tioredoxina ou tioredoxina redutase funcional podem crescer porque usam o sistema de glutatona-glutaredoxina. Em contraste, o estudo descrito aqui, implica que a tioredoxina reductase de *C. neoformans* é essencial para o crescimento, sugerindo que em *C. neoformans* o sistema redox tiol alternativo não substitui o sistema redox tioredoxina, já que na presença de H₂O₂ e menadiona o sistema tiol-redox específico, não consegue proteger as células contra estas espécies tóxicas, visto na susceptibilidade apresentada no mutante. A menadiona e outros agentes redox são reduzidos na célula pelo NADPH e oxidoreductases para produzir aniões superóxido. Em *E. coli*, a tioredoxina pode reduzir a menadiona (Holmgren, 1979). No nosso caso, se sugere que como a *TRR1* é inibida, a tioredoxina de *C. neoformans* não é capaz de reduzir a menadiona, tornando-se incapaz de retirar elétrons da via tioredoxina. Hipoteticamente é de esperar que o nível de dissulfetos aumente, e se desencadeie uma resposta celular para superar a oxidação.

A cepa *P_{CTR4-2}/TRR1* também foi avaliada na presença dos estressores osmóticos KCl 1,5 M e Sorbitol 2,5 M, que indicariam defeitos na permeabilidade da membrana plasmática, no entanto o

mutante apresentou o mesmo padrão de crescimento observado na cepa selvagem H99 (dados não mostrados) quando as células foram incubadas a 30 °C por 4 dias em YPD-BCS (200 μM) e YPD-cobre (25 μM). Dados proteômicos demonstraram que tanto a tioredoxina redutase como a glutathiona redutase são induzidas durante o choque osmótico (Rodrigues *et al.*, 2016). Em *C. albicans*, tem sido mostrado que o gene *TRR1* é induzido durante o estresse oxidativo pelo H₂O₂ e no estresse osmótico (Enjalbert *et al.*, 2003). Estudos em *S. cerevisiae*, mostraram que mutantes deficientes em glutaredoxina são sensíveis ao estresse osmótico e oxidativo, sugerindo uma ligação entre esses dois tipos de condições de estresse (Rodriguez-Manzaneque *et al.*, 1999).

4.7 Produção de Melanina

O fenótipo seguinte avaliado neste estudo foi a melanina; a capacidade de produção de melanina com formação de colônias marrons está relacionada com a patogênese de alguns fungos e corresponde a um fator virulência em *C. neoformans* importante. Assim foi testada a capacidade de melanização do mutante *P_{CTR4-2}/TRR1* em meio MM e observou-se que após 48 h no meio não houve diferença de melanização entre o mutante e o selvagem H99 (Figura 69).

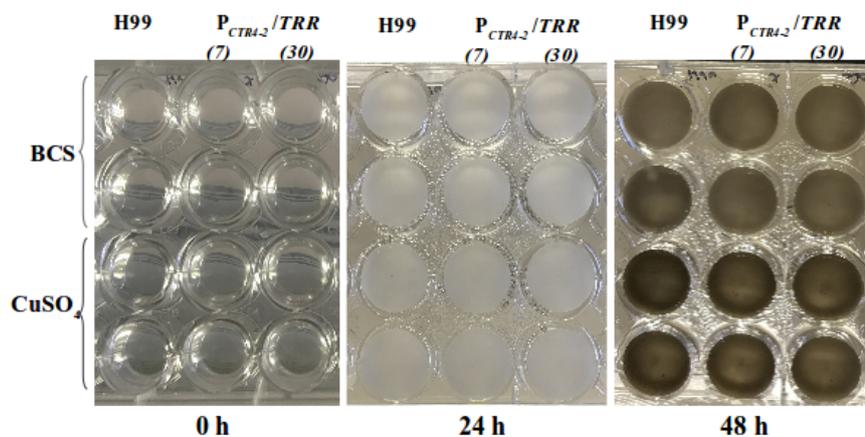


Figura 69. Produção de melanina por *P_{CTR4-2}/TRR1* de *C. neoformans*. As leveduras foram cultivadas em MM durante 2 dias a 30 °C/150 rpm, com a adição de BCS 200 μM ou CuSO₄ 25 μM, na presença de 1 mM de L-DOPA, ao abrigo da luz. 7 e 30 são os clones testados para a cepa *P_{CTR4-2}/TRR1*.

A melanina confere resistência a oxidantes microbicidas tanto em cepas de tipo selvagem como mutantes do fungo *C. neoformans* (Jacobson *et al.*, 1995). A DOPA-melanina de *C. neoformans* é importante para a virulência desses agentes patogênicos. (Wang *et al.*, 1995). Estudos na bactéria *S. meliloti* demonstraram que a expressão do gene tioredoxina (*trxL*) é induzida durante a produção de pigmentos, portanto a hipótese de que a proteína TrxL está envolvida na produção de melanina na cepa selvagem *S. meliloti* CE52G (Castro-Sowinski *et al.*, 2007).

Outros estudos tem relatado, que as concentrações de cobre exógeno (~50 μM) induzem a expressão de lacase e a produção de melanina em *C. neoformans*, e a indução do gene lacase *CnLac1* por cobre é regulada pelo fator de transcrição dependente de cobre 1 (*CUF1*) (Jiang *et al.*, 2009). Além disso, a expressão do transportador de cobre fúngico CTR4 em *C. neoformans* é regulada pelo *CUF1* em condições de baixa disponibilidade de cobre. Mutantes *cuf1* exibem um grave defeito de crescimento e uma diminuição da atividade lacase (Waterman *et al.*, 2007). A adição de 1 mM do quelante de cobre BCS ao meio abole a atividade da lacase não apenas no mutante *Δvph1* , mas também na cepa de tipo selvagem, enquanto que a suplementação com cobre restaura a atividade da enzima e induz a sua transcrição (Zhu *et al.*, 2003). Assim, como a lacase é uma oxidase dependente de cobre responsável pela melanização, poderia se explicar porque as cepas tratadas com cobre apresentam uma intensidade marrom mais forte.

4.8 Efeito de $P_{CTR4-2}/TRR1$ sobre a expansão da cápsula

A cápsula polissacarídica extracelular é considerada um dos mais importantes fatores de virulência para *C. neoformans* (Coenjaerts, 2006). Os resultados para o mutante $P_{CTR4-2}/TRR1$ demonstram que após 48 h de indução da cápsula, houve uma diminuição significativa do tamanho da cápsula quando comparado com H99 (Figura 70). Várias enzimas estão envolvidas na formação de cápsula polissacarídea (Zaragoza *et al.*, 2009), mas, até o momento, não há estudos que verifiquem que a alteração da expressão de *TRR1* pode estar associada à redução do tamanho da cápsula no fungo *C. neoformans*. Essas observações sugerem a hipótese de que *TRR1* desempenha um papel regulador no tráfego de proteínas envolvidas na sínteses capsular. Além, estas alterações podem estar relacionadas ao promotor CTR4.

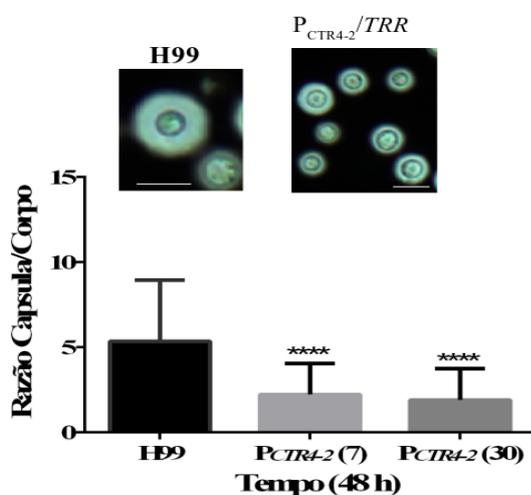


Figura 70. Avaliação do tamanho da cápsula na cepa mutante $P_{CTR4-2}/TRR1$. A indução de cápsula foi realizada em meio mínimo contendo tiamina (com adição de CuSO_4 na cepa $P_{CTR4-2}/TRR1$. 7 e 30, clones) após incubação a 30 °C/48 h, e visualização com tinta nanquim. Imagens captadas utilizando o microscópio de luz (Axiovert 100, Carl Zeiss) objetiva EC Plan Neofluor 40x. Escala de 10 μm . Teste estatístico ANOVA, $p < 0,0001$.

4.9 Efeito das moléculas inibidores sob o crescimento do $P_{CTR4-2}/TRR1$

O efeito das moléculas inibitórias (Mol_14 e Mol_3) e o composto antifúngico fluconazol, foram avaliados na condição na qual o *TRR1* é reprimido com CuSO_4 . Para análise qualitativa foram realizados os ensaios de diluição seriada das células de 10^7 a 10^2 , e inoculadas em ágar YPD contendo a concentração do composto de inibição no meio de crescimento com BCS (200 μM) ou CuSO_4 (25 μM) a 30 °C x 48 h (Figura 71).

Uma vez confirmada a regulação da expressão do gene *TRR1* na presença de cobre (crescimento das cepas $P_{CTR4-2}/TRR1$ até a diluição 10^6), decidiu-se avaliar se o crescimento celular na presença das moléculas antifúngicas inviabilizaria completamente o crescimento de $P_{CTR4-2}/TRR1$ na presença de CuSO_4 . As concentrações avaliadas com a molécula 3 foram 64 (CIM) e 32 $\mu\text{g/mL}$. Na concentração mais alta foi observado que as leveduras $P_{CTR4-2}/TRR1$ foram mais afetadas de tal forma que só conseguiram crescer na densidade celular de 10^7 (primeiro poço) quando comparadas com a cepa $P_{CTR4-2}/TRR1$ crescida só na presença de cobre. Já na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$ a cepa mutante não apresentou diferenças de crescimento em relação à cepa crescida em YPD-cobre. Para avaliar a capacidade de inibição da molécula 14 na cepa mutante, concentrações de 16 (CIM) e 8 $\mu\text{g/mL}$ foram testadas. Nenhuma das duas concentrações mostraram um defeito de crescimento na cepa $P_{CTR4-2}/TRR1$ crescida na presença de cobre. Na figura acima somente é apresentado o resultado com 16 $\mu\text{g/mL}$ da molécula, visto que com 8 $\mu\text{g/mL}$ o crescimento das cepas foi similar. Em relação com a cepa H99 essas moléculas não tiveram impacto significativo na presença de BCS ou CuSO_4 com crescimento observado até a densidade 10^3 . Com o antifúngico fluconazol, o crescimento celular no BCS parece que diminuiu apenas na densidade de 10^3 . Adicionalmente as observações mostram que o composto inibitório (Mol_3 - 64 $\mu\text{g/mL}$) parece gerar um efeito aditivo com a redução da expressão de *TRR1* enquanto que com a molécula 14 e o fluconazol, este efeito não foi observado.

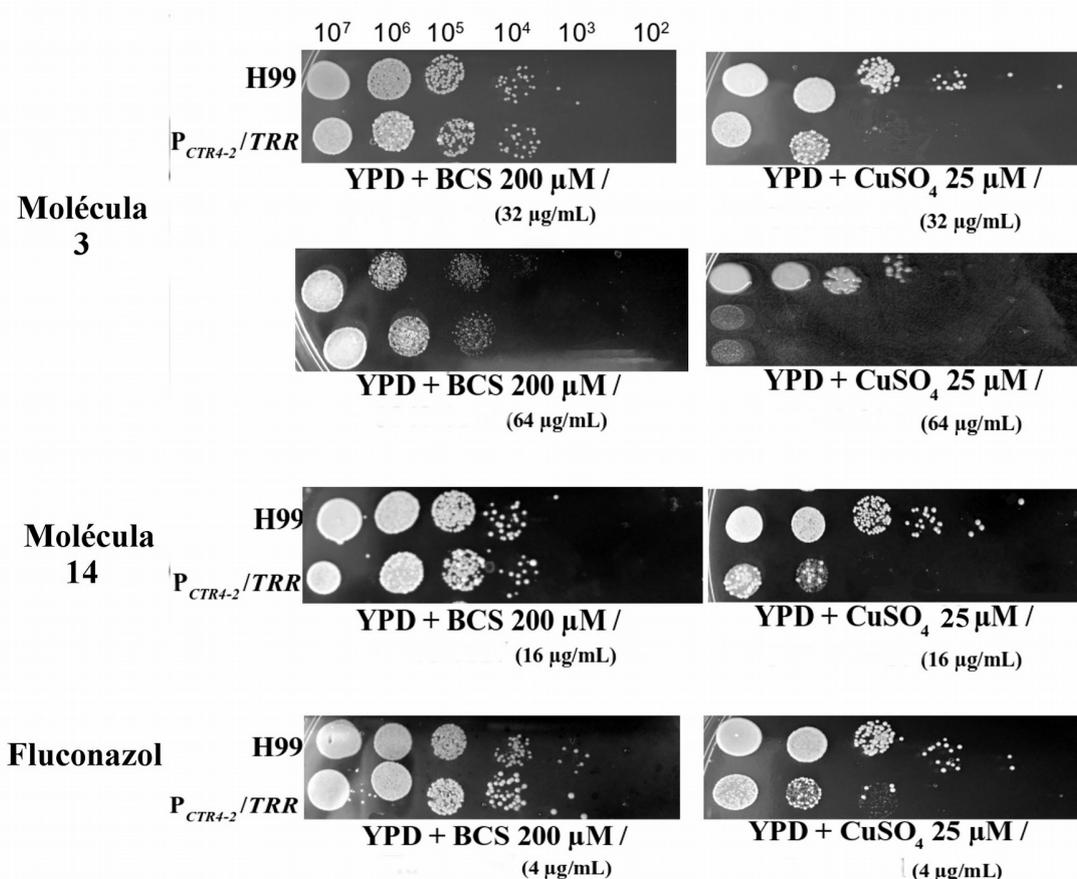


Figura 71. Determinação de crescimento das cepas H99 e $P_{CTR4-2}/TRR1$ de *C. neoformans* em presença das moléculas antifúngicas em ágar YPD contendo BCS e $CuSO_4$ a 30 °C.

4.10 Determinação das curvas de crescimento

Para mensurar o número de UFC as leveduras foram crescidas na ausência e presença das moléculas (14 e 3) por até 72 h para examinar a atividade de inibição em YPD contendo BCS ou $CuSO_4$. Aliquotas foram coletadas as 6, 24, 48 e 72 h de crescimento a 30 °C, e semeadas para contagem das UFC (**Figura 72**). A quantificação das UFC mostrou que H99 apresentou um nível de crescimento muito similar com BCS ou cobre. Já para a cepa mutante $P_{CTR4-2}/TRR1$, o número de UFC quantificadas às 24 - 72 h é menor na cultura contendo $CuSO_4$, confirmando mais uma vez como o gene *TRR1* é regulado em função da disponibilidade de cobre.

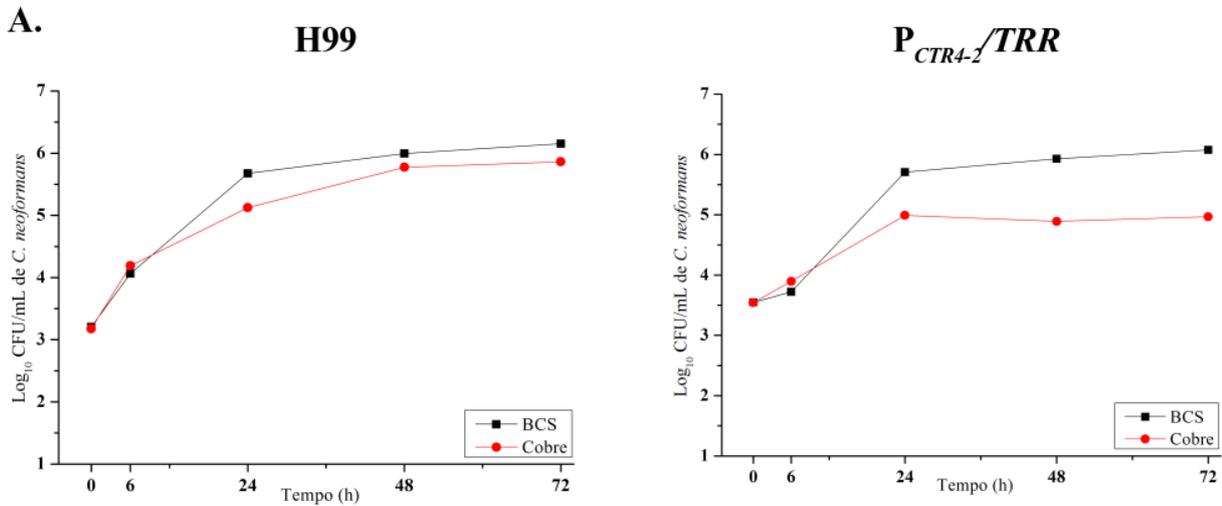


Figura 72. Curvas de crescimento da cepa selvagem H99 e mutante P_{CTR4-2}/TRR1 de *C. neoformans* (log UFC/mL). Cepas crescidas em YPD contendo BCS (200 µM) e CuSO₄ (25 µM)

Posteriormente, foi avaliada a atividade inibitória das moléculas 3 e 14 em condições nas quais TRR1 é inibido. As curvas de UFC mostraram que as moléculas 14 (8 µg/mL) e 3 (32 µg/m) adicionadas ao meio de crescimento contendo CuSO₄ afetam ligeiramente o número de células P_{CTR4-2}/TRR1, ou seja não há um impacto no crescimento celular nessas concentrações. No meio com BCS + moléculas inibitórias a contagem de células da cepa mutante e o H99 também revelou a pouca atividade que as moléculas exerceram nas leveduras, resultado que leva a pensar que as concentrações usadas (menores que o CIM) são baixas e não inibem de forma significativa o crescimento celular da cepa H99 (**Figura 73**).

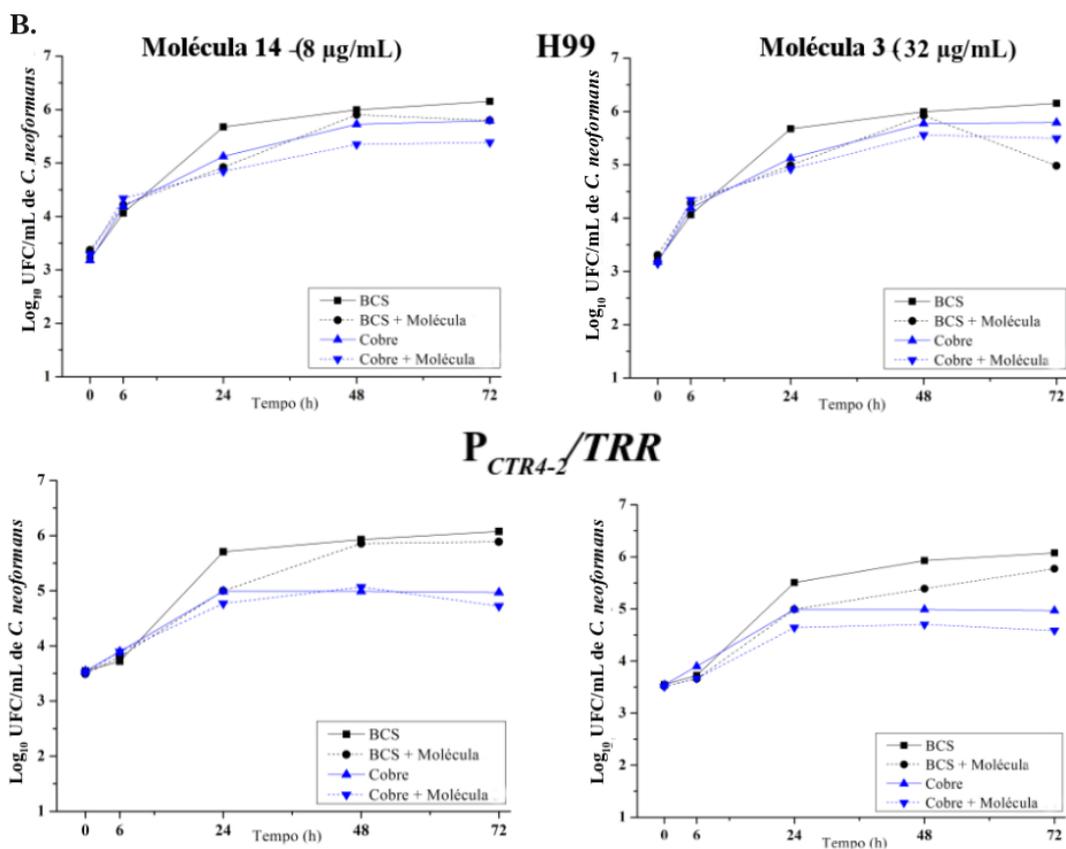


Figura 73. Curvas de crescimento da atividade inibitória das moléculas 14 e 3 da cepa selvagem H99 e mutante $P_{CTR4-2}/TRR1$ de *C. neoformans* (log UFC/mL), nas condições com BCS ou CuSO_4 a 30°C x 72 h.

No presente estudo, foi mostrado que quando a tioredoxina redutase é reprimida, as moléculas inibidoras na presença de cobre, só conseguem diminuir o crescimento celular ligeiramente, ou seja, as leveduras se mantêm viáveis após o tratamento após contagem das colônias. Estudos adicionais com fluconazol ($4\ \mu\text{g/mL}$) revelaram que em as ambas as cepas este agente teve pouca atividade antifúngica e não conseguiu inibir o crescimento celular (dados não mostrados). Isso provavelmente devido à concentração empregada, o que sugere que testes em concentrações maiores devem ainda ser realizados (doses subinibitórias) para observar uma desregulação gênica.

A fim de testar se a concentração das moléculas inibitórias altera a capacidade de crescimento do mutante $P_{CTR4-2}/TRR1$, foram realizadas novas curvas de crescimento para observar se a exposição ao cobre e o aumento da concentração das moléculas tem efeito sobre a inibição do gene. Inicialmente, as curvas de crescimento foram determinadas para H99 e $P_{CTR4-2}/TRR1$ na ausência das moléculas. Um total de 1×10^5 células de cada cepa de *C. neoformans* foi cultivada a 30°C em YPD e YNB contendo BCS ou CuSO_4 . A densidade óptica foi medida a $600\ \text{nm}$ a cada 30 min, sendo que as medidas foram

plotadas nos gráficos (**Figura 74**). As células de H99 mostraram iguais níveis de crescimento em meios contendo BCS ou CuSO_4 após 72 h de incubação. Em contraste, após 12 h em cultura, a absorvância das células tanto em YPD como YNB das cepas $P_{CTR4-2}/TRR1$ apresentou diminuição na presença de cobre (25 μM) como esperado.

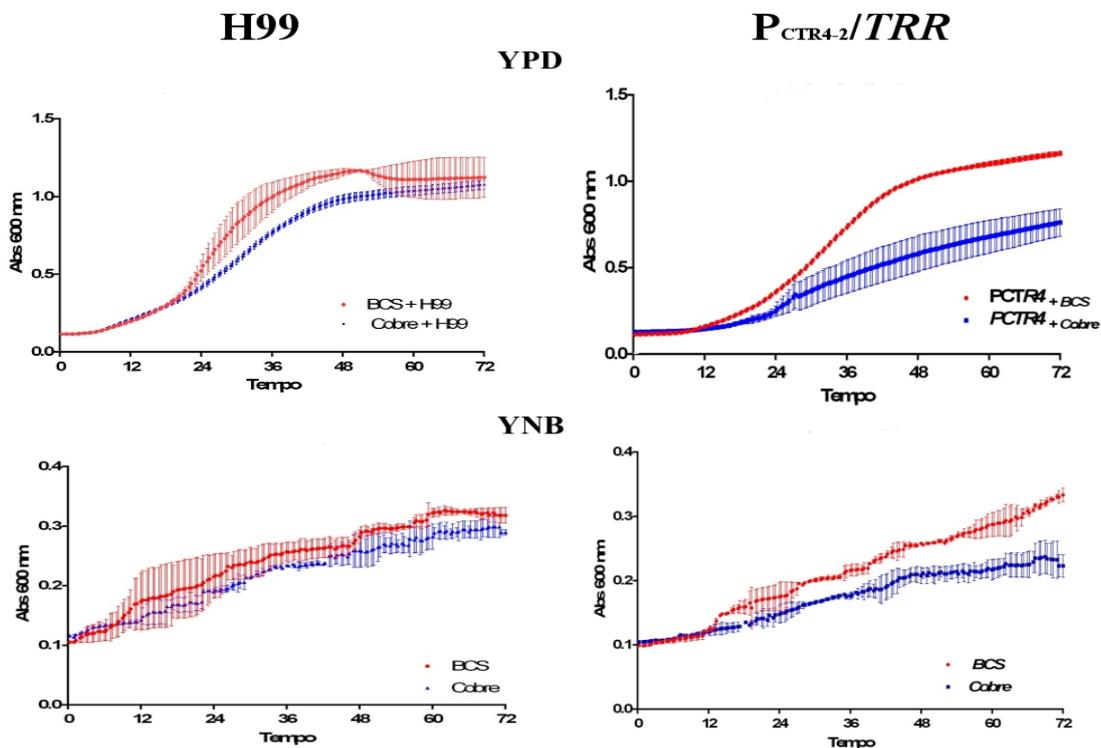


Figura 74. Curvas de crescimento das cepas $P_{CTR4-2}/TRR1$ e H99 crescidas em YPD e YNB contendo BCS (200 μM) e CuSO_4 (25 μM) a 30 °C após 72 h de incubação no leitor de microplaca (BioTek EON) A600 nm. Cepas selvagem e mutante com a sua respetiva desviação.

Diante da observação em meio sólido de que mutante não apresentaram um crescimento celular reduzido com as concentrações de 32 (Mol_3) e 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Mol_14) suplementado com BCS ou CuSO_4 a 30 °C, foram realizadas novas curvas de crescimento aumentando a concentração das moléculas (Mol_3 = 128, 64 e 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e Mol_14= 32 e 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a fim de melhor visualizar o defeito sobre o H99 e sob o mutante $P_{CTR4-2}/TRR1$ na presença de CuSO_4 (**Figura 75**).

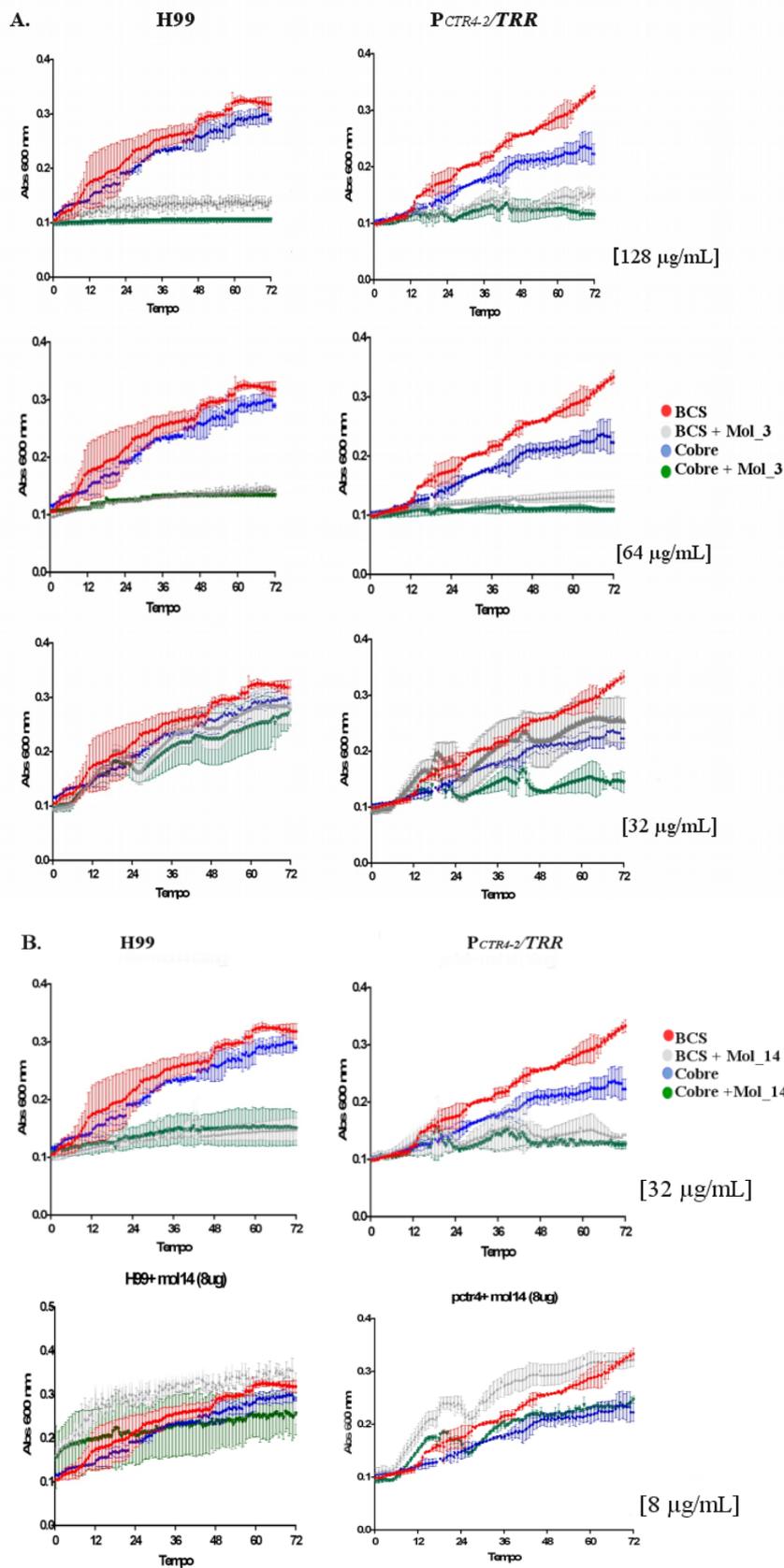


Figura 75. Curvas de crescimento das linhagens mutante *P_{CTR4-2}/TRR1* e selvagem H99 em presença das moléculas inibitórias (A) Molécula 3 (128, 64 e 32 µg/mL). (B) Molécula 14 (32 e 8 µg/mL), crescidas em YNB contendo BCS (200 µM) ou CuSO₄ (25 µM) a 30 °C após 72 h de incubação no leitor de microplaca (BioTek EON) A₆₀₀ nm.

Os resultados da **Figura 75A** mostram que a molécula 3 consegue inibir o crescimento tanto da cepa selvagem como da mutante nas concentrações 128 e 64 $\mu\text{g/mL}$. Já para a concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$ é observada uma redução de crescimento do mutante $P_{CTR4-2}/TRRI$ na presença de cobre (verde), enquanto que com BCS + molécula 3 (cinza) é observada uma curva parecida só com cobre (azul). Assim, a molécula 3 na presença de cobre tem um efeito pronunciado no crescimento celular possivelmente devido à inibição do gene *TRRI*, sugerindo um efeito sinérgico que é mantido ao longo do tempo. Esse resultado preliminar supõe que um ataque sobre a enzima antioxidante tioredoxina redutase com a molécula inibitória 3, aditiva a inibição do crescimento do fungo patogênico *C. neoformans*. A **Figura 75B** mostra o efeito inibitório da molécula 14 na concentração 32 e 16 $\mu\text{g/mL}$ (não mostrado) sobre o fungo em ambas as cepas. Já para a concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$, pode-se ver que a molécula 14 não tem efeito no crescimento celular quando *TRRI* é inibida com cobre no intervalo de 0-72 h. Desse modo, a cepa mutante cultivada em BCS ou CuSO_4 na presença ou ausência da molécula 14, mostrou que as reduções de crescimento com e sem este composto não foram diferentes.

A avaliação do mutante P_{CTR4-2}/FAS (ácido graxo sintase, componente de membrana lipídica) com 8 $\mu\text{g/mL}$ de fluconazol, detectou um efeito sinérgico entre as leveduras viáveis e a presença de este antifúngico com o CuSO_4 (25 μM). Além disso, o fluconazol tornou-se fungicida nas cepas mutantes + CuSO_4 às 72 h, com a morte total do inóculo. Os autores atribuem esse resultado aos defeitos gerados na membrana celular pelo bloqueio de ergosterol e do ácido graxo. Pelo contrario, a caspofungina um inibidor da enzima da parede celular em uma concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$ teve pouca atividade anticriptocócica e não houve aumento detectável da atividade antifúngica para as cepas mutantes P_{CTR4-2}/FAS . (Chayakulkeeree *et al.*, 2007).

5. CONCLUSÕES CAPÍTULO III

- O promotor endógeno do gene essencial *TRR1* de *C. neoformans* foi substituído pelo promotor controlado por cobre P_{CTR4-2} .
- Foi feita a construção do cassete *TRR1-mCherry* e a Microscopia de fluorescência utilizando essa linhagem confirmou a expressão da proteína fluorescente.
- O promotor endógeno do gene essencial *TRR1* de *C. neoformans* foi substituído pelo promotor controlado por cobre P_{CTR4-2} .
- A cepa mutante $P_{CTR4-2}/TRR1$ apresentou-se mais sensível a estressores como peróxido e menadiona e a produção de capsula foi também afetada.
- A capacidade de melanização do mutante $P_{CTR4-2}/TRR1$ no meio MM não foi afetada.
- Os resultados para a cepa mutante $P_{CTR4-2}/TRR1$ em presença de cobre demonstram que após 48 h de indução da cápsula, houve uma diminuição significativa do tamanho desta quando comparado com H99.
- O crescimento celular na presença das moléculas antifúngicas não inviabilizou completamente o crescimento de $P_{CTR4-2}/TRR1$ na presença de $CuSO_4$. No entanto, com a molécula 3 na concentração de $64\mu g/mL$ foi observado que as leveduras $P_{CTR4-2}/TRR1$ foram mais afetadas quando comparadas com a cepa $P_{CTR4-2}/TRR1$ crescida só na presença de cobre.
- A quantificação das UFC mostrou que para a cepa mutante $P_{CTR4-2}/TRR1$, o número de células de levedura quantificadas após 12 h em presença de cobre é menor do que o número de células da cultura em BCS, confirmando a correta construção do mutante condicional.
- A molécula 3 afetou o crescimento da cepa mutante $P_{CTR4-2}/TRR1$ quando suplementada com $25\ \mu M$ de cobre.

PERSPECTIVAS

Para o conhecimento complementar da estrutura tridimensional e bioquímica da Trr1, pretende-se cristalizar a proteína no seu estado reduzido. Os dados adquiridos serão de grande importância porque podem auxiliar no desenvolvimento de novas drogas.

Em longo prazo estima-se que sejam realizados os experimentos de co-cristalização, refinamento e resolução estrutural da proteína na presença das moléculas inibidoras que apresentaram atividade antifúngica *in vitro*.

Ainda há a expectativa de obtenção de cristais Trr1 complexados com o seu substrato Trx1 e a parametrização do cofator NADPH para aumento da confiabilidade dos resultados de dinâmica molecular.

Considerando os resultados preliminares *in vitro* e *in vivo*, pretende-se modificar a estrutura química das moléculas que apresentaram atividade antifúngica visando uma maior eficiência da atividade antifúngica.

Co-localizar a proteína fluorescente TRR1-mCherry na célula fúngica.

Investigar o papel de *TRR1* (cepa mutante $P_{CTR4-2}/TRR1$) na regulação de vias de sinalização (Rad53) envolvidas na resposta ao estresse oxidativo em fungos patogênicos humanos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadio, R., Kioshima, E. S., Teixeira, M. M., Martins, N. F., Maigret, B., Sueli, M., e Felipe, S. (2011) Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. *BMC Genomics*, 12, 75. doi:10.1186/1471-2164-12-75
- Abadio, R., Kioshima E. S., Leroux V., Martins N. F., Maigret B., Felipe M.S.S. (2015) Identification of New Antifungal Compounds Targeting Thioredoxin Reductase of Paracoccidioides Genus. *PLoS ONE* 10(11): e0142926
- Adler, A. J., Greenfield N. J., Fasman G.D. (1973) Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. *Methods Enzymol* 27:675–735
- Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve R. W., Adams P. D. (2005) The Phenix refinement framework. *CCP4 Newsletter on Protein Crystallography*, v. 42
- Agarwal, A.K., Xu T, Jacob M.R., et al. (2008) Genomic and genetic approaches for the identification of antifungal drug targets. *Infect Disord Drug Target*; 8:2–15
- Aminnejad, M., Diaz, M., Arabatzis, M., Castañeda, E., Lazera, M., Velegraki, A., Marriott, D., Sorrell, T. C., e Meyer, W. (2012) Identification of Novel Hybrids Between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII. *Mycopathologia*, 173(5-6), 337–346. doi:10.1007/s11046-011-9491-x
- Andes, D. (2013) Optimizing antifungal choice and administration. *Current medical research and opinion*, 29 Suppl 4(December), 13–8. doi:10.1185/03007995.2012.761135
- Andricopulo A.D., Akoachere, M. B., Krogh, R., Nickel, C., McLeish M. J., Kenyon G. L., Arscott, L. D., Williams, C. H Jr., Davioud-Charvet, E., Becker, K. (2006) Specific inhibitors of *Plasmodium falciparum* thioredoxin reductase as potential antimalarial agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 15;16(8):2283-92
- Aki, H., e Yamamoto, M. (1991) Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis: Flow microcalorimetric approaches. *Biochemical Pharmacology*. Volume 41, Issue 1, 1 January, Pages 133-138
- Arnér, E. S., e Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, 267(20), 6102-6109
- Bao, R., Zhang, Y., Zhou, C. Z., e Chen, Y. (2009) Structural and mechanistic analyses of yeast mitochondrial thioredoxin Trx3 reveal putative function of its additional cysteine residues. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1794(4), 716–721. doi:10.1016/j.bbapap.2008.12.016
- Barrett, D. (2002) From natural products to clinically useful antifungals. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. doi:10.1016/S0925-4439(02)00085-6
- Bauer H, Gromer S, Urbani A, Schnölzer M, Schirmer RH, Müller HM. (2003) Thioredoxin reductase from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Eur J Biochem*. 270: 4272–4281

- Beautrait, A., Leroux, V., Chavent, M., Ghemtio, L., Devignes, M. D., Smail-Tabbone, M., Cai, W., Shao, X., Moreau, G., Bladon, P., Yao, J., e Maigret, B. (2008) Multiple-step virtual screening using VSM-G: Overview and validation of fast geometrical matching enrichment. *Journal of Molecular Modeling*. doi:10.1007/s00894-007-0257-9
- Bellemare DR, Sanschagrín M, Beaudoin J, Labbé S. (2001) A novel copper-regulated promoter system for expression of heterologous proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene*.273(2):191–198. doi: 10.1016/S0378-1119(01)00591-1
- Berenguer, J., Rodríguez-Tudela, J. L., Richard, C., Alvarez, M., Sanz, M. A., Gaztelurrutia, L., Ayats, J., e Martínez-Suarez, J. V. (1997) Deep infections caused by *Scedosporium prolificans*. A report on 16 cases in Spain and a review of the literature. *Scedosporium Prolificans Spanish Study Group. Medicine (Baltimore)*, 76(4), 256–265.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., e Bourne, P. E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic acids research*, 28(1), 235–242. doi:10.1093/nar/28.1.235
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 42(Web Server issue), W252–W258
- Bicanic, T., Muzoora, C., Brouwer, A. E., Meintjes, G., Longley, N., Taseera, K., Rebe, K., Loyse, A., Jarvis, J., Bekker, L.-G., Wood, R., Limmathurotsakul, D., Chierakul, W., Stepniewska, K., White, N. J., Jaffar, S., e Harrison, T. S. (2009) Independent association between rate of clearance of infection and clinical outcome of HIV-associated cryptococcal meningitis: analysis of a combined cohort of 262 patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(5), 702–709. doi:10.1086/604716
- Blankenhorn G. (1976). Nicotinamide-dependent one- electron and two- electron (flavin) oxidoreduction: thermodynamics, kinetics and mechanism. *Eur J Biochem* 67: 67–80
- Bolon, D. N., e Mayo, S. L. (2001) Polar residues in the protein core of *Escherichia coli* thioredoxin are important for fold specificity. *Biochemistry*, 40(34), 10047–10053. doi:10.1021/bi010427y
- Bowie J. R., Luthy. R., Eisenberg. D. (1991) A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*. 253:164–170.
- Bratton, E. W., Husseini, N. El, Chastain, C. A., Lee, M. S., Poole, C., St??rmer, T., Weber, D. J., Juliano, J. J., e Perfect, J. R. (2013) Approaches to antifungal therapies and their effectiveness among patients with cryptococcosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(6), 2485–2495. doi:10.1128/AAC.01800-12
- Brizendine, K. D., Baddley, J. W., e Pappas, P. G. (2013) Predictors of Mortality and Differences in Clinical Features among Patients with Cryptococcosis According to Immune Status. *PLoS ONE*., 8(3). doi:10.1371/journal.pone.0060431
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. a R., Levitz, S. M., Netea, M. G., e White, T. C. (2012) Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Science Translational Medicine*, 4(165), 165rv13.
- Butts, A., e Krysan, D. J. (2012) Antifungal drug discovery: Something old and something new. *PLoS Pathog*, 8(9), e1002870. doi:10.1371/journal.ppat.1002870

- Bravo-Chaucanés *et al.* (2014) Expressão e caracterização enzimática da Tioredoxina redutase (Trr1) e do seu substrato Tioredoxina (Trx1) e identificação de novas drogas por modelagem molecular do alvo Trr1 do fungo patogênico *Cryptococcus neoformans*. Dissertação de mestrado. UnB. Brasília, Brasil
- Calderone, R., Fonzi, W., Gay-Andrieu, F., Sun, N., Li, D., Chen, H., e Alex, D. (2012) 16 Antifungals and Antifungal Drug Discovery. *Antimicrobial Drug Discovery: Emerging Strategies*, 22, 247
- Carmel-Harel O., Stearman R., Gasch A. P., Botstein D., Brown P. O., Storz G. (2001). Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 39 595–605. 10.1046/j.1365-2958.2001.02255.x
- Cartagena-Lirola, H., Guerini, I., Manfrini, N., Lucchini, G., e Longhese, M. P. (2008) Role of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad53 checkpoint kinase in signaling double-strand breaks during the meiotic cell cycle. *Mol Cell Biol*, 28(14), 4480–4493. doi:10.1128/MCB.00375-08.
- Castro-Sowinski S., Matan O., Bonafede P., Okon Y. (2007). A thioredoxin of *Sinorhizobium meliloti* CE52G is required for melanin production and symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20 986–993 10.1094/MPMI-20-8-0986
- Catalano-Dupuy D. L., Musumeci M. A., López-Rivero A., Ceccarelli E. A. (2011) A Highly Stable Plastidic-Type Ferredoxin-NADP(H) Reductase in the Pathogenic Bacterium *Leptospira interrogans*. *PLoS ONE*6(10): e26736
- Capitani, G., Marković-Housley, Z., DelVal, G., Morris, M., Jansonius, J. N., e Schürmann, P. (2000) Crystal structures of two functionally different thioredoxins in spinach chloroplasts. *Journal of molecular biology*, 302(1), 135–154. doi:10.1006/jmbi.2000.4006
- Chakrabarti, a, Srivastava, S., Swaminathan, C. P., Surolia, a, e Varadarajan, R. (1999) Thermodynamics of replacing an alpha-helical Pro residue in the P40S mutant of *Escherichia coli* thioredoxin. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 8(11), 2455–9. doi:10.1110/ps.8.11.2455
- Chayakulkeeree, M., Rude, T. H., Toffaletti, D. L., e Perfect, J. R. (2007) Fatty acid synthesis is essential for survival of *Cryptococcus neoformans* and a potential fungicidal target. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3537–3545. doi:10.1128/AAC.00442-07
- Chen, Y., Toffaletti, D. L., Tenor, J. L., Litvintseva, A. P., Fang, C., Mitchell, T. G., McDonald, T. R., Nielsen, K., Boulware, D. R., Bicanic, T., e Perfect, J. R. (2014) The *Cryptococcus neoformans* transcriptome at the site of human meningitis. *mBio*, 5(1). doi:10.1128/mBio.01087-13
- Chen, *et al.* (2010) Molproibity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta crystallographica D*66: 12-21
- Cheng, Y.C., & Prusoff, W. H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology*, 22, 3099 – 3108
- Chivers, P. T., e Raines, R. T. (1997) General acid/base catalysis in the active site of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry*, 36(50), 15810–15816. doi:10.1021/bi9715041
- Chong, C., e Sullivan, D. J. (2007) New uses for old drugs. *Nature*, 448(7154)

- Clendenon, J. L., Phillips, C. L., Sandoval, R. M., Fang, S., e Dunn, K. W. (2002) Vox: a PC-based, near real-time volume rendering system for biological microscopy. *American journal of physiology. Cell physiology*, 282(1), C213–8.
- Coenjaerts, F. E. J. (2006) The sixth international conference on *Cryptococcus* and cryptococcosis (Conference report). *FEMS Yeast Res.*, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 312-317
- Collin, B., Clancy, C. J., e Nguyen, M. H. (1999) Antifungal resistance in non- albicans *Candida* species. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 2(1), 9–14. doi:10.1054/drup.1998.0059
- Cowtan, K. (1994) Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography 31, 34– 38. *There is no corresponding record for this reference*
- Cseke, L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., e Westfall, M. V. (2011) *Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine*. CRC press.
- da Silva Dantas, A., Patterson, M. J., Smith, D. a, Maccallum, D. M., Erwig, L. P., Morgan, B. a, e Quinn, J. (2010) Thioredoxin regulates multiple hydrogen peroxide-induced signaling pathways in *Candida albicans*. *Molecular and cellular biology*, 30(19), 4550–4563. doi:10.1128/MCB.00313-10
- da Silva Rodrigues *et al.* (2016) Da Silva Rodrigues LN, De Almeida Brito W, Parente AFA, Weber SS, Bailão AM, Casaletti L, Borges CL, De Almeida Soares CM. Osmotic stress adaptation of *Paracoccidioides lutzii*, Pb01, monitored by proteomics. *Fungal Genetics and Biology*. 2016;95:13–23
- Dai, S., Saarinen, M., Ramaswamy, S., Meyer, Y., Jacquot, J. P., e Eklund, H. (1996) Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* NADPH dependent thioredoxin reductase at 2.5 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 264, 1044–1057. doi:10.1006/jmbi.1996.0695
- Dauter, Z., e Jaskolski, M. (2010) How to read (and understand) Volume A of International Tables for Crystallography: an introduction for nonspecialists. *Journal of Applied Crystallography*, 43(5), 1150–1171.
- Davidson, R. C., Blankenship, J. R., Kraus, P. R., de Jesus Berrios, M., Hull, C. M., D’Souza, C., Wang, P., e Heitman, J. (2002) A PCR-based strategy to generate integrative targeting alleles with large regions of homology. *Microbiology*, 148(8), 2607–2615. doi:10.1099/00221287-148-8-2607
- Davioud-Charvet, E., McLeish, M. J., Veine, D. M., Giegel, D., Arscott, L. D., Andricopulo, A. D., Becker, K., Müller, S., Schirmer, R. H., Williams, C. H., e Kenyon, G. L. (2003) Mechanism-Based Inactivation of Thioredoxin Reductase from *Plasmodium falciparum* by Mannich Bases. Implication for Cytotoxicity. *Biochemistry*, 42(45), 13319–13330. doi:10.1021/bi0353629
- Day, J. N., Chau, T. T. H., Wolbers, M., Mai, P. P., Dung, N. T., Mai, N. H., Phu, N. H., Nghia, H. D., Phong, N. D., e Thai, C. Q. (2013) Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. *New England Journal of Medicine*, 368(14), 1291–1302.
- De Azevedo, W. F., Canduri, F., Dos Santos, D. M., Silva, R. G., De Oliveira, J. S., De Carvalho, L. P. S., Basso, L. A., Mendes, M. A., Palma, M. S., e Santos, D. S. (2003) Crystal structure of human purine nucleoside phosphorylase at 2.3 Å resolution. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308(3), 545–552. doi:10.1016/S0006-291X(03)01431-1
- Dixon DA., Lindner DL., Branchaud B., Lipscomb WN. (1979). Conformations and electronic

structures of oxidized and reduced isoalloxazine. *Biochemistry* 18:5770–5775

- Doering, T. L. (2009). How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annual Review of Microbiology*, 63, 223–247. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162753
- D’Arcy A, Villard F, Marsh M. An automated microseed matrix-screening method for protein crystallization. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2007;63:550–554
- D’Souza, C. A., F. Hagen, et al. (2004). Investigation of the basis of virulence in serotype A strains of *Cryptococcus neoformans* from apparently immunocompetent individuals. *Curr Genet* 46(2): 92-102. Epub 2004 May 19.
- Du, X., Li, Y., Xia, Y.-L., Ai, S.-M., Liang, J., Sang, P., Liu, S.-Q. (2016). Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 144. <http://doi.org/10.3390/ijms17020144>
- Eklund, H., Gleason, F. K., e Holmgren, a. (1991) Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins*, 11(1), 13–28. doi:10.1002/prot.340110103
- Emsley, P., e Cowtan, K. (2004) Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(12 I), 2126–2132
- Enjalbert, B., A. Nantel, e M. Whiteway. (2003) Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. *Mol. Biol. Cell* 14:1460–1467
- Eswar, N. *et al.* (2001) Comparative protein structure modeling using modeller. *Current Protocols in Protein Science*. [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc., ISBN 9780471140863
- Evans, P. R. (1997) Jnt CCP4/ESF–EACBM Newsl. *Protein Crystallogr*, 33, 22–24
- Fanning, S., e Mitchell, A. P. (2012) Fungal biofilms. *PLoS Pathog*, 8(4), e1002585
- Feenstra, K. A. (2002). Long term dynamics of proteins and peptides Groningen: s.n
- Felipe, M. S., Andrade, R. V, Arraes, F. B., Nicola, A. M., Maranhao, A. Q., Torres, F. A., Silva-Pereira, I., Pocas-Fonseca, M. J., Campos, E. G., Moraes, L. M., Andrade, P. A., Tavares, A. H., Silva, S. S., Kyaw, C. M., Souza, D. P., Pereira, M., Jesuino, R. S., Andrade, E. V, Parente, J. A., Oliveira, G. S., Barbosa, M. S., Martins, N. F., Fachin, A. L., Cardoso, R. S., Passos, G. A., Almeida, N. F., Walter, M. E., Soares, C. M., Carvalho, M. J., e Brigido, M. M. (2005) Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem*, 280(26), 24706–24714. doi:M500625200 [pii]\n10.1074/jbc.M500625200
- Ferr -D’Amar, A. R., e Burley, S. K. (1994) Use of dynamic light scattering to assess crystallizability of macromolecules and macromolecular assemblies. *Structure (London, England)*, 2(5), 357–359.
- Gandin, V. *et al.* (2015) Metal- and Semimetal-Containing Inhibitors of Thioredoxin Reductase as Anticancer Agents. *Molecules*. 20:12732–12756
- Garcia-Pino, A., Martinez-Rodriguez, S., Wahni, K., Wyns, L., Loris, R., e Messens, J. (2009) Coupling of Domain Swapping to Kinetic Stability in a Thioredoxin Mutant. *Journal of Molecular Biology*, 385(5), 1590–1599. doi:10.1016/j.jmb.2008.11.040

- Garibotto, F. M., Garro, A. D., Masman, M. F., Rodríguez, A. M., Luiten, P. G. M., Raimondi, M., Zacchino, S. A., Somlai, C., Penke, B., e Enriz, R. D. (2010) New small-size peptides possessing antifungal activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18(1), 158–167. doi:10.1016/j.bmc.2009.11.009
- Gebre A. A., Okada, H., Kimm C., Kubom K., Ohnuki, S., Ohya. Y. (2015) Profiling of the effects of antifungal agents on yeast cells based on morphometric analysis. *FEMS Yeast Res.*15:fov040
- Giacovazzo, C., Monaco, H. L., Artioli, G., Viterbo, D., Milanesio, M., Gilli, G., Gilli, P., Zanotti, G., Ferraris, G., e Catti, M. (2011) *Fundamentals of crystallography*. *Journal of Microscopy* (Vol. 198). doi:10.1093/acprof:oso/9780199573653.001.0001
- Gleason, F. K. (1992) mutation of conserved residues in escherichia-coli thioredoxin - effects on stability and function. *protein science*, 1(5), 609–616
- Godoy, J.S.R., Kioshima, É.S., Abadio, A.K.R. et al. (2016) Structural and functional characterization of the recombinant thioredoxin reductase from *Candida albicans* as a potential target for vaccine and drug design. *Appl Microbiol Biotechnol* 100: 4015.
- Gouet, P. E., Courcelle, D. I., Metz S. F. (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript, *Bioinformatics*. 15. 305–308
- Grant, C.M., MacIver, F.M., and Dawes, I.W. (1996c) Stationary phase induction of GLR1 expression is mediated by the yAP-1 transcriptional protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 22: 739–746.
- Graybill, J. R. (2000) The role of murine models in the development of antifungal therapy for systemic mycoses. *Drug Resist. Updat.*, v. 3, p. 364-383
- Hagen, F., Illnait-Zaragozi, M.-T., Bartlett, K. H., Swinne, D., Geertsen, E., Klaassen, C. H. W. Boekhout, T., e Meis, J. F. (2010) In vitro antifungal susceptibilities and amplified fragment length polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary, and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(12),5139–5145
- Heitman, J., Kozel, T. R., Kwon-Chung, K. J., Perfect, J. R., e Casadevall, A. (2010) *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*. ASM press
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., e Cabisco, E. (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1780(11), 1217–35
- Hirt, R. P., Muller, S., Embley, T. M., e Coombs, G. H. (2002) The diversity and evolution of thioredoxin reductase: new perspectives. *Trends Parasitol*, 18(7), 302–308.
- Hof, H. (2010) Mycoses in the elderly. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. doi:10.1007/s10096-009-0822-5
- Horecká, T. (1998) Purification and partial characterization of thioredoxin reductase from *Streptomyces aureofaciens* . *Biochemistry and molecular biology international* Vol. 46, No. 4, November. pages 657-665
- Holmgren, A. (1985) Thioredoxin. *Annual review of biochemistry*, 54(1), 237–271.
- Holmgren, A. (1995) Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure*, 3(3), 239–243. doi:10.1016/S0969-2126(01)00153-8

- Hornbeck, P. V. (1991) Enzyme-linked immunosorbent assays. *Current protocols in immunology*, 1–2
- Hu, W., Sillaots, S., Lemieux, S., Davison, J., Kauffman, S., Breton, A., Linteau, A., Xin, C., Bowman, J., Becker, J., Jiang, B., e Roemer, T. (2007) Essential gene identification and drug target prioritization in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens*, 3(3). doi:10.1371/journal.ppat.0030024
- Ianiri, G., e Idnurm, A. (2015). Essential Gene Discovery in the Basidiomycete *Cryptococcus neoformans* for Antifungal Drug Target Prioritization. *mBio*, 6(2), e02334–14.
- Idnurm, A., Bahn, Y.-S., Nielsen, K., Lin, X., Fraser, J. A., e Heitman, J. (2005) Deciphering the Model Pathogenic Fungus *Cryptococcus Neoformans*. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 753–764. doi:10.1038/nrmicro1245
- Institute, C. e L. S. (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard. *CLSI document M38-A2*
- Jacobson, E. S., E. Hove, e H. S. Emery. (1995) Antioxidant function of melanin in black fungi. *Infect. Immun.* 63:4944-4945
- Janbon, G., e Doering, T. L. (2011) Biosynthesis and genetics of the Cryptococcal capsule. *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast*, Heitman J, Kozel T, Kwon-Chung J, Perfect J, et al, 27–42
- Janbon, G., Ormerod, K. L., Paulet, D., Byrnes, E. J., Yadav, V., Chatterjee, G., Mullapudi, N., Hon, C. C., Billmyre, R. B., Brunel, F., Bahn, Y. S., Chen, W., Chen, Y., Chow, E. W. L., Copp??e, J. Y., Floyd-Averette, A., Gaillardin, C., Gerik, K. J., Goldberg, J., Gonzalez-Hilarion, S. et al. (2014) Analysis of the Genome and Transcriptome of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* Reveals Complex RNA Expression and Microevolution Leading to Virulence Attenuation. *PLoS Genetics*, 10
- Jez, J. M., Schlegel, B. P., Penning T. M. (1996) Characterization of the substrate binding site in rat liver 3 α -hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase. The roles of tryptophans in ligand binding and protein fluorescence *J Biol Chem.* Nov 22; 271(47): 30190–30198
- Jiang N., Sun N., Xiao D., Pan J., Wang Y., Zhu X. (2009). A copper-responsive factor gene *CUF1* is required for copper induction of laccase in *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 296, 84–90.
- Kanzok, S.M., Schirmer, R.H., Turbachova, I., Iozef, R., Becker, K. (2000) The thioredoxin system of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Glutathione reduction revisited. *J Biol Chem.* 275:40180–40186
- Knoke, M., e Schwesinger, G. (1994) One hundred years ago: the history of cryptococcosis in Greifswald. *Medical mycology in the nineteenth century. Mycoses*, 37(7-8), 229–233.
- Kontou, M., Will, R. D., Adelfalk, C., Wittig, R., Poustka, A., Hirsch-Kauffmann, M., e Schweiger, M. (2004) Thioredoxin, a regulator of gene expression. *Oncogene*, 23(12), 2146–2152. doi:10.1038/sj.onc.1207334
- Kraus, P. R., Boily, M. J., Giles, S. S., Stajich, J. E., Allen, A., Cox, G. M., Dietrich, F. S., Perfect, J. R., e Heitman, J. (2004) Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. *Eukaryotic Cell*, 3(5), 1249–1260. doi:10.1128/EC.3.5.1249-1260.2004

- Krnajski, Z., Gilberger, T.-W., Walter, R. D., Cowman, A. F., e Müller, S. (2002) Thioredoxin Reductase Is Essential for the Survival of *Plasmodium falciparum* Erythrocytic Stages. *Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 25970–25975
- Koch O, *et al.*, (2013). "Identification of *M. tuberculosis* Thioredoxin Reductase Inhibitors Based on High-Throughput Docking Using Constraints." *J Med Chem.* 2013 27; 56(12): 4849-4859
- Konev, S. V. e Udenfriend S. (1967). Fluorescence and phosphorescence of proteins and nucleic acids, Plenum Press New York.
- Kozakov D., Hall DR., Xia B., Porter KA., Pothorny D., Yueh C., Beglov D., Vajda S. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature Protocols*.Feb;12(2):255-278
- Kubiseski, T. J., Hyndman, D. J., Morjana, N. A, e Flynn T. G. (1992) Studies on pig muscle aldose reductase. Kinetic mechanism and evidence for a slow conformational change upon coenzyme binding. 267:6510
- Kumar S., Nussinov R (2001) How do thermophilic proteins deal with heat? *Cell Mol Life Sci* 58(9):1216–1233
- Kwon-Chung, K. J., e Varma, A. (2006) Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Research*. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00088.x
- Lacey, B. M., Eckenroth, B. E., Flemer, S., & Hondal, R. J. (2008) Selenium in Thioredoxin Reductase: A Mechanistic Perspective. *Biochemistry*, 47(48), 12810–12821
- Ladbury, J. E., Kishore, N., Hellinga, H. W., Wynn, R., e Sturtevant, J. M. (1994) Thermodynamic effects of reduction of the active-site disulfide of *Escherichia coli* thioredoxin explored by differential scanning calorimetry. *Biochemistry*, 33(12), 3688–92. Obtido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8142367>
- Lakowicz, J.R. (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed.; *Springer*: New York, NY, USA, Chapter 8, p. 698. 41
- Lakowicz, J. R., Masters, B. R. (2008) Principles of fluorescence spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, v. 13, p. 029-901
- Larsen, R. A., Bauer, M., Thomas, A. M., & Graybill, J. R. (2004). Amphotericin B and Fluconazole, a Potent Combination Therapy for Cryptococcal Meningitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(3), 985–991.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26:283-291
- Lattman, E. E., e Loll, P. J. (2008) *Protein crystallography: a concise guide*. JHU Press
- Laurent, T. C., Moore, E. C., Reichard. P. (1964) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. I V. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. 239:3436–3444
- Lee, A., Toffaletti, D. L., Tenor, J., Soderblom, E. J., Thompson, J. W., Moseley, M. A., Price, M., e Perfect, J. R. (2010) Survival defects of *Cryptococcus neoformans* mutants exposed to human cerebrospinal fluid result in attenuated virulence in an experimental model of meningitis. *Infection and Immunity*, 78(10), 4213–4225. doi:10.1128/IAI.00551-10

- Lee C-H, Chang T-Y, Liu J-W, Chen F-J, Chien C-C, Tang Y-F, Lu C-H. (2012) Correlation of anti-fungal susceptibility with clinical outcomes in patients with cryptococcal meningitis. *BMC Infectious Diseases* 12:361
- Lee, S., Kim, S. M., e Lee, R. T. (2013) Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxidants & redox signaling*, 18(10), 1165–207. doi:10.1089/ars.2011.4322
- Lee YH, Tamura K, Maeda M, Hoshino M, Sakurai K, et al. (2007) Cores and pH-dependent dynamics of ferredoxin-NADP reductase revealed by hydrogen/deuterium exchange. *J Biol Chem.* 282:5959–5967
- Lennon, B. W., Williams, C. H., e Ludwig, M. L. (2000) Twists in catalysis: alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5482), 1190–4. doi:10.1126/science.289.5482.1190
- Leslie, A. G. W. (1992) Jnt CCP4/ESF–EACBM Newsl. *Protein Crystallogr*, 26, 27–33
- Leslie, A. G. W. (2006) The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* (Vol. 62, p. 48–57). doi:10.1107/S0907444905039107
- Lewin, A., Crow, A., Hodson, C. T. C., Hederstedt, L., e Le Brun, N. E. (2008) Effects of substitutions in the CXXC active-site motif of the extracytoplasmic thioredoxin ResA. *Biochemical Journal*, 414(1), 81–91.
- Lewis, R. E. (2011) Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*, 86(8), 805–817. doi:10.4065/mcp.2011.0247
- Li, B., Lin, S. X. 1996. Fluorescence-energy transfer in human estradiol 17 beta-dehydrogenase-NADPH complex and studies on the coenzyme binding. *Eur J Biochem* 235:180–186. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.00180.x
- Limacher, A., Glaser, A. G., Meier, C., Schmid-Grendelmeier, P., Zeller, S., Scapozza, L., e Cramer, R. (2007) Cross-reactivity and 1.4-Å crystal structure of *Malassezia sympodialis* thioredoxin (Mala s 13), a member of a new pan-allergen family. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(1), 389–96. doi:10.1093/infdis/jii1389 [pii].
- Lin, X, e Heitman J. (2006). The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Ann Rev Microbiol*; 60: 69-105
- Lissi, E., calderón, C., campos, A. (2013) Evaluation of the number of binding sites in proteins from their intrinsic fluorescence: Limitations and pitfalls. *Photochemistry and Photobiology*, v. 89, n.6, p. 1413–1416
- Litvin, D. B. (2008) Tables of crystallographic properties of magnetic space groups. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography*, 64(3), 419–424.
- Loftus, B. J., Fung, E., Roncaglia, P., Rowley, D., Amedeo, P., Bruno, D., Vamathevan, J., Miranda, M., Anderson, I. J., Fraser, J. A., Allen, J. E., Bosdet, I. E., Brent, M. R., Chiu, R., Doering, T. L., Donlin, M. J., D'Souza, C. A., Fox, D. S., Grinberg, V., Fu, J., Fukushima, M., Haas, B. J., Huang, J. C., et al. (2005) The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*, 307(5713), 1321–1324. doi:10.1126/science.1103773

- Loyse, A., Thangaraj, H., Easterbrook, P., Ford, N., Roy, M., Chiller, T., Govender, N., Harrison, T. S., e Bicanic, T. (2013) Cryptococcal meningitis: Improving access to essential antifungal medicines in resource-poor countries. *The Lancet Infectious Diseases*. doi:10.1016/S1473-3099(13)70078-1
- Machado, A. K., Morgan, B. A., e Merrill, G. F. (1997) Thioredoxin reductase-dependent inhibition of MCB cell cycle box activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(27), 17045–17054. doi:10.1074/jbc.272.27.17045
- Masur ,H., Kaplan, J.E. (2009) New Guidelines for the Management of HIV-Related Opportunistic Infections. *JAMA*. 301(22):2378–2380. doi:10.1001/jama.2008.865
- Mathavan, A., ramdass, A., rajagopal, S. (2015) A Spectroscopy Approach for the Study of the Interaction of Oxovanadium(IV)-Salen Complexes with Proteins, *J. Fluoresc., USA*, Jun. v. 25, p. 1141-1149
- Mathes R. L., Reber A. J., Hurley D. J., Dietrich U. M. (2010). Effects of antifungal drugs and delivery vehicles on morphology and proliferation of equine corneal keratocytes in vitro. *Am J Vet Res*. Aug;71(8):953-9. doi: 10.2460/ajvr.71.8.953
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., Read, R.J. J. Phaser crystallographic software. *Appl. Cryst.* (2007). **40**, 658-674
- McFadden D., Zaragoza O. e Casadevall A. (2006) The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol.* 14(11):497-505
- McNeil, M. M., Nash, S. L., Hajjeh, R. A., Phelan, M. A., Conn, L. A., Plikaytis, B. D., e Warnock, D. W. (2001) Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980–1997. *Clinical Infectious Diseases*, 33(5), 641–647.
- Missall, T. A., e Lodge, J. K. (2005) Thioredoxin reductase is essential for viability in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 4(2), 487–489. doi:10.1128/EC.4.2.487-489.2005
- Moraes E. M., Primola N.S., Hamdan J. S (2003) Antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal drugs determined by two techniques. *Mycoses* 46:164–168
- Muller, E. G. D. (1991) Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 266(14), 9194–9202.
- Mulrooney, S. B., e Williams, C. H. (1997). Evidence for two conformational states of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*: use of intrinsic and extrinsic quenchers of flavin fluorescence as probes to observe domain rotation. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 6(10), 2188–2195.
- Murphy, R. (1997) Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what can we learn? *Current Opinion in Biotechnology*, 8(1), 25–30. doi:doi: 10.1016/s0958-1669(97)80153-x
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., e Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. doi:10.1107/S09074444996012255
- Ngamskulrungrroj, P., Chang, Y., Sionov, E., e Kwon-Chung, K. J. (2012) The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. *mBio*, 3(3), e00103–12. doi:10.1128/mBio.00103-12

- Ngamskulrungrroj, P., e Meyer, W. (2009) Melanin production at 37 C is linked to the high virulent *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype VGIIa. *Aust Mycol*, 28, 9–14.
- Nivinskas, H., Jacquot, J. e Čenas, N. (2014) Conformational Change of *Arabidopsis thaliana* Thioredoxin Reductase after Binding of Pyridine Nucleotide and Thioredoxin. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 56(3-4), pp. 188-192. Retrieved 11 Dec. 2017, from doi:10.1515/znc-2001-3-404
- Nordberg, J., e Arnér, E. S. J. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*. doi:10.1016/S0891-5849(01)00724-9
- Oblong, J. E., Berggren, M., Gasdaska, P. Y., Powis G. (1994) Site-directed mutagenesis of active site cysteines in human thioredoxin produces competitive inhibitors of human thioredoxin reductase and elimination of mitogenic properties of thioredoxin. *J Biol Chem*. Apr 22; 269(16): 11714–11720.
- O’Meara, T. R., e Andrew Alspaugh, J. (2012) The *Cryptococcus neoformans* capsule: A sword and a shield. *Clinical Microbiology Reviews*. doi:10.1128/CMR.00001-12
- Odds, F. C., Brown, A. J. P., e Gow, N. A. R. (2003) Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends in Microbiology*. doi:10.1016/S0966-842X(03)00117-3
- Odom, a, Muir, S., Lim, E., Toffaletti, D. L., Perfect, J., e Heitman, J. (1997) Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *The EMBO journal*, 16(10), 2576–2589. doi:10.1093/emboj/16.10.2576
- Okagaki L.H., Strain A.K., Nielsen J.N., Charlier C., Baltés N.J., Chrétien F., Heitman J., Dromer F. & Nielsen K. (2010) Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *Plos Pathogens* 6(6):1-15.
- Oliveira, M. A., Discola, K. F., Alves, S. V., Medrano, F. J., Guimaraes, B. G., e Netto, L. E. S. (2010) Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. *Biochemistry*, 49(15), 3317–3326. doi:10.1021/bi901962p
- Ory, J. J., Griffith, C. L., e Doering, T. L. (2004) An efficiently regulated promoter system for *Cryptococcus neoformans* utilizing the CTR4 promoter. *Yeast*, 21(11), 919–926. doi:10.1002/yea.1139
- Otwinowski, Z., e Minor, W. (1997) Macromolecular Crystallography Part A. *Methods in Enzymology* (Vol. 276, p. 307–326). doi:10.1016/S0076-6879(97)76066-X
- Pace N., R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the bio- sphere. *Science*. doi:10.1126/science.276.5313.734
- Palde P. B., Carroll K. S. (2015) A universal entropy-driven mechanism for thioredoxin-target recognition. *PNAS*. June 30, vol. 112 . no. 26
- Pappas, P. G. (2013) Lessons learned in the multistate fungal infection outbreak in the United States. *Current opinion in infectious diseases*, 26(6), 545–50. doi:10.1097/QCO.0000000000000013
- Pappas, P. G., Alexander, B. D., Andes, D. R., Hadley, S., Kauffman, C. a, Freifeld, A., Anaissie, E. J., Brumble, L. M., Herwaldt, L., Ito, J., Kontoyiannis, D. P., Lyon, G. M., Marr, K. a, Morrison, V. a, Park, B. J., Patterson, T. F., Perl, T. M., Oster, R. a, Schuster, M. G., Walker, R., Walsh, T. J., Wannemuehler, K. a, e Chiller, T. M. (2010) Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET).

Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 50(8), 1101–1111. doi:10.1086/651262

- Park, B. J., Wannemuehler, K. A., Marston, B. J., Govender, N., Pappas, P. G., e Chiller, T. M. (2009) Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*, 23(4), 525–530. doi:10.1097/QAD.0b013e328322ffac
- Park, M. J., Gwak, K. S., Yang, I., Kim, K. W., Jeung, E. B., Chang, J. W. e Choi, I. G. (2009) Effect of citral, eugenol, nerolidol and a-terpineol on the ultrastructural changes of Trichophyton mentagrophytes. *Fitoterapia* 80, 290–296
- Patterson, S., Alphey, M. S., Jones, D. C., Shanks, E. J., Street, I. P., Frearson, J. A., Fairlamb, A. H. (2011). Dihydroquinazolines as a Novel Class of *Trypanosoma brucei* Trypanothione Reductase Inhibitors: Discovery, Synthesis, and Characterization of their Binding Mode by Protein Crystallography. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(19), 6514–6530
- Pearson, G. D., e Merrill, G. F. (1998) Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* TRR1 gene encoding thioredoxin reductase inhibits p53-dependent reporter gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5431–5434. doi:10.1074/jbc.273.10.5431
- Pedrajas, J. R., Kosmidou, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J. A., Wright, A. P., e Spyrou, G. (1999) Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 274(10), 6366–6373.
- Perea, S., Lopez-Ribot, J. L., Kirkpatrick, W. R., McAtee, R. K., Santillin, R. A., Martinez, M., Calabrese, D., Sanglard, D., e Patterson, T. F. (2001) Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(10), 2676–2684. doi:10.1128/AAC.45.10.2676-2684.2001
- Pereira, D. G. (2007) Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 1, 171-177, 2007
- Pérez-Ruiz, *et al.* (2009) The Quaternary Structure of NADPH Thioredoxin Reductase C Is Redox-Sensitive. *Molecular Plant*. Volume 2, Issue 3, May. Pages 457-467
- Perfect, J. R. (2013) Efficiently killing a sugar-coated yeast. *New England Journal of Medicine*, 368(14), 1354–1356.
- Perfect, J. R., Dismukes, W. E., Dromer, F., Goldman, D. L., Graybill, J. R., Hamill, R. J., Harrison, T. S., Larsen, R. a, Lortholary, O., Nguyen, M.-H., Pappas, P. G., Powderly, W. G., Singh, N., Sobel, J. D., e Sorrell, T. C. (2010) Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50(3), 291–322. doi:10.1086/649858
- Perlin, D. S. (2011) Current perspectives on echinocandin class drugs. *Future microbiology*, 6(4), 441–457. doi:10.2
- Pfaller, M. A., Sheehan, D. J., e Rex J. H. (2004) Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:268-280.217/fmb.11.19
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., MENG, E. C., FERRIN, T. E. (2004) UCSF chimera visualization system for exploratory research and analysis.

J. Comput. Chem., v. 25, p. 1605-1612

- Pierce, C. G., Srinivasan, A., Uppuluri, P., Ramasubramanian, A. K., e Lopez-Ribot, J. L. (2013) Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(5), 726–730. doi:10.1016/j.coph.2013.08.008
- Powis, G., e Montfort, W. R. (2001) Properties and biological activities of thioredoxins. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 41(9), 261–95. doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.261
- Pronk, S. *et al.* (2013) GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. PMID: 23407358PMCID: PMC3605599: Bioinformatics (Oxford, England), 1 abr. v. 29, n. 7, p. 845–854.
- Pukkila-Worley, R., Gerrald, Q. D., Kraus, P. R., Boily, M. J., Davis, M. J., Giles, S. S., Cox, G. M., Heitman, J., e Alspaugh, J. A. (2005) Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. *Eukaryotic Cell*, 4(1), 190–201. doi:10.1128/EC.4.1.190-201.2005
- Qin, J., Clore, G. M., e Gronenborn, A. M. (1994) The high-resolution three-dimensional solution structures of the oxidized and reduced states of human thioredoxin. *Structure*, 2(6), 503–522.
- Rajasingham R, Smith R.M., Park B. J., Jarvis J. N., Govender N. P., Chiller T. M., *et al.* (2017) Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis*. May 5.
- Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C., e Sasisekharan, V. (1963) Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of molecular biology*, 7(1), 95–99. doi:10.1016/S0022-2836(63)80023-6
- Reis, M. P. C., Carvalho, C. R. C., Andrade, F. A., Fernandes, O. F. L., Arruda, W. e Silva, M. R. R. (2016) Fisetin as a promising antifungal agent against *Cryptococcus neoformans* species complex. *J Appl Microbiol*, 121: 373–379. doi:10.1111/jam.13155
- Rhodes, G. (2006) Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models. *Complementary science series* (Vol. 35). doi:10.1002/bmb.89
- Rispail, N., Soanes, D. M., Ant, C., Czajkowski, R., Grünler, A., Huguet, R., Perez-Nadales, E., Poli, A., Sartorel, E., e Valiante, V. (2009) Comparative genomics of MAP kinase and calcium–calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 46(4), 287–298.
- Rodriguez-Manzaneque, M. T., *et al.* (1999) Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 19,8180-90.
- Roemer, T., e Krysan, D. J. (2014) Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. doi:10.1101/cshperspect.a019703.
- Romão *et al.*, (2015) No Title. *Marcos historicos em cristalografia*, Série II / Número 136.
- Rolston, K. V. I. (2013) Editorial commentary: Cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii*. *Clinical infectious diseases*, 57(4), 552–554.
- Roos, G., Foloppe, N., Van Laer, K., Wyns, L., Nilsson, L., Geerlings, P., e Messens, J. (2009) How thioredoxin dissociates its mixed disulfide. *PLoS Computational Biology*, 5(8). doi:10.1371/journal.pcbi.1000461

- Rosa e Silva, L. K., Staats, C. C., Goulart, L. S., Morello, L. G., Pelegrinelli Fungaro, M. H., Schrank, A., e Vainstein, M. H. (2008) Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. *Research in Microbiology*, 159(3), 221–229. doi:10.1016/j.resmic.2007.12.006
- Rose, G. D. (1978) Prediction of chain turns in globular proteins on a hydrophobic basis. *Nature*, 272(5654), 586–590. doi:10.1038/272586a0
- Ruggiero, A., Masullo M., Ruocco M. R., Grimaldi P., Lanzotti M. A., et al. (2009) Structure and stability of a thioredoxin reductase from *Sulfolobus solfataricus*: A thermostable protein with two functions., *Biochimica et Biophysica Acta* 1794. 554–562
- Saccoccia, F., Angelucci, F., Boumis, G., Carotti, D., Desiato, G., Miele, A. E., e Bellelli, A. (2014). Thioredoxin Reductase and its Inhibitors. *Current Protein & Peptide Science*, 15(6), 621–646. <http://doi.org/10.2174/1389203715666140530091910>
- Saïdani, N., Grando, D., Valadié, H., Bastien, O., e Maréchal, E. (2009) Potential and limits of in silico target discovery—Case study of the search for new antimalarial chemotherapeutic targets. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(3), 359–367
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., e Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory press. New York. doi:574.873224 1/1989
- Sambrook, J., e Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sarmiento, G. P., Vitale, R. G., Afeltra, J., Moltrasio, G. Y., e Moglioni, A. G. (2011) Synthesis and antifungal activity of some substituted phenothiazines and related compounds. *Eur J Med Chem*, 46(1), 101–105. doi:S0223-5234(10)00759-2 [pii]r10.1016/j.ejmech.2010.10.019
- Schmid, N. et al. (2011) Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 13154B7. PMID: 21533652: European biophysics journal: EBJ, jul. v. 40, n. 7, p. 843–856
- Schneider, C. a, Rasband, W. S., e Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. doi:10.1038/nmeth.2089
- Schuttelkopf, A. W., Aalten, D. M. F. VAN. (2004) PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. PMID: 15272157: Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography, ago.. v. 60, n. Pt 8, p. 1355–1363
- Scrutton, N. S., Berry, A. & Perham, R. N. (1990). Redesign of the coenzyme specificity of a de hydrogenase by protein engineering. *Nature*, 343, 38–43
- Shapiro, R. S., Robbins, N., e Cowen, L. E. (2011) Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 75(2), 213–267. doi:10.1128/MMBR.00045-10
- Silva F. D., Rossi D. C., Martinez L. R., Frases S., Fonseca F. L., Campos C. B., et al. . (2011). Effects of microplusin, a copper-chelating antimicrobial peptide, against *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 324, 64–72. 10.1111/j.1574-6968.2011.02386.x
- Singhal, T. (2013) Newer antifungals. *Pediatric Infectious Disease*, 5(2), 78–82.
- Sionov, E., Chang, Y. C., e Kwon-Chung, K. J. (2013) Azole heteroresistance in *Cryptococcus neoformans*: Emergence of resistant clones with chromosomal disomy in the mouse brain during

- fluconazole treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(10), 5127–5130. doi:10.1128/AAC.00694-13.
- Skjoldager, N., Blanner Bang, M., Rykær, M., Björnberg, O., Davies, M. J., Svensson, B., Hägglund, P. (2017). The structure of *Lactococcus lactis* thioredoxin reductase reveals molecular features of photo-oxidative damage. *Scientific Reports*, 7, 46282
- Slaby, I., e Holmgren, A. (1975) Reconstitution of *Escherichia coli* thioredoxin from complementing peptide fragments obtained by cleavage at methionine 37 or arginine 73. *Journal of Biological Chemistry*, 250(4), 1340–1347.
- Sloan, D. J., Dediccoat, M. J., e Laloo, D. G. (2009) Treatment of cryptococcal meningitis in resource limited settings. *Current opinion in infectious diseases*, 22(5), 455–63. doi:10.1097/QCO.0b013e32832fa214
- Srinivasan, A., Lopez-Ribot, J. L., e Ramasubramanian, A. K. (2014) Overcoming antifungal resistance. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11(1), 65–71. doi:10.1016/j.ddtec.2014.02.005
- Stein, N. (2008) CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. *Journal of Applied Crystallography*, 41(3), 641–643.
- Sweeney, N. L., Lipker, L., Hanson, A. M., Bohl, C. J., Engel, K. E., Kalous, K. S., Schwan, W. R. (2017). Docking into *Mycobacterium tuberculosis* Thioredoxin Reductase Protein Yields Pyrazolone Lead Molecules for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 6(1), 4
- Takahashi, H. T., Britta, E. A., Longhini, R., Ueda-Nakamura, T., Mello, J. C. P, Nakamura, C.V. (2013) Antileishmanial activity of 5-methyl-2,2' : 5',2"-terthiophene isolated from *Porophyllum ruderale* is related to mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis*. *Planta Med.* 79(5):330–333
- Tanaka, K., e Russell, P. (2004) Cds1 phosphorylation by Rad3-Rad26 kinase is mediated by forkhead associated domain interaction with Mrc1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32079–32086. doi:10.1074/jbc.M404834200
- Taylor, G. (2003) The phase problem. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 59(11), 1881–1890
- Taylor, G. L. (2010) Introduction to phasing. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(4), 325–338. doi:10.1107/S0907444910006694
- Thompson J. D., Higgins, D. G., Gibson T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22. 4673–4680.
- Toffaletti, D. L., Rude, T. H., Johnston, S. A., Durack, D. T., e Perfect, J. R. (1993) Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *Journal of Bacteriology*, 175(5), 1405–1411
- Trott, O., e Olson, A. J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461
- Tu, S. C. (1981) Spectral characterization of a fluorescent nicotinamide adenine dinucleotide analog: 3-Aminopyridine adenine dinucleotide. *Arch Biochem Biophys* 208487-494

- Upadhyay, R., Kim, H., Jung, K. W., Park, G., Lam, W., Lodge, J. K., e Bahn, Y. S. (2013) Sulphiredoxin plays peroxiredoxin-dependent and -independent roles via the HOG signalling pathway in *Cryptococcus neoformans* and contributes to fungal virulence. *Molecular Microbiology*, 90(3), 630–648. doi:10.1111/mmi.12388
- Uppuluri, P., Chaturvedi, A. K., Srinivasan, A., Banerjee, M., Ramasubramaniam, A. K., Khler, J. R., Kadosh, D., e Lopez-Ribot, J. L. (2010) Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathogens*, 6(3). doi:10.1371/journal.ppat.1000828
- Uziel, O., Borovok, I., Schreiber, R., Cohen, G., e Aharonowitz, Y. (2004) Transcriptional Regulation of the *Staphylococcus aureus* Thioredoxin and Thioredoxin Reductase Genes in Response to Oxygen and Disulfide Stress. *Journal of Bacteriology*, 186(2), 326–334. doi:10.1128/JB.186.2.326-334.2004
- Vandeputte, P., Ferrari, S., e Coste, A. T. (2012) Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International Journal of Microbiology*. Doi:10.1155/2012/713687
- Van Den Berg, P. A. W., Mulrooney, S. B., Gobets, B., Van Stokkum, I. H. M., Van Hoek, A., Williams, C. H., & Visser, A. J. W. G. (2001). Exploring the conformational equilibrium of *E. coli* thioredoxin reductase: Characterization of two catalytically important states by ultrafast flavin fluorescence spectroscopy. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 10(10), 2037–2049.
- Vartivarian, S. E., Anaissie, E. J., Cowart, R. E., Sprigg, H. a, Tingler, M. J., e Jacobson, E. S. (1993) Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *The Journal of infectious diseases*, 167(1), 186–190. doi:10.1093/infdis/167.1.186
- Vazquez, J. A., Miceli, M. H., e Alangaden, G. (2013) Invasive fungal infections in transplant recipients. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 1(3), 85–105. doi:10.1177/2049936113491936.
- Verma, A., et al. (2016) NADP⁺ binding effects tryptophan accessibility, folding and stability of recombinant *B. malayi* G6PD. *Int. J. Biol. Macromol.* 85:645-654.
- Waksman, G., Krishna, T. S. R., Williams, C. H. & Kuriyan, J. (1994). Crystal structure of *Escherichia coli* thioredoxin reductase refined at 2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 236, 800- 816
- Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* 1995;8:127–134
- Wang, Y., P. Aisen, e A. Casadevall. (1995) *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence:mechanism of action. *Infect. Immun.* 63:3131-3136
- Waterman, S.R., Hacham, M. Hu. G .et al. (2007) Role of a CUF1/CTR4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest* 117: 794–802
- Wang, P. F., Marcinkeviciene, J., Williams, C. H., Blanchard Jr, J. S. (1998) Thioredoxin reductase thioredoxin fusion enzyme from *Mycobacterium leprae*: comparison with the separately expressed thioredoxin reductase. *Biochemistry.* Nov 17; 37(46): 16378–16389
- Weichsel, A., Gasdaska, J. R., Powis, G., e Montfort, W. R. (1996) Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer. *Structure*, 4(6), 735–751

- Williams, C. H., David Arscott, L., Müller, S., Lennon, B. W., Ludwig, M. L., Wang, P. F., Veine, D. M., Becker, K., e Heiner Schirmer, R. (2000) Thioredoxin reductase: Two modes of catalysis have evolved. *European Journal of Biochemistry*. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01702.x
- Wood, P. M., e Hollomon, D. W. (2003) A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. *Pest Management Science*. doi:10.1002/ps.655
- Xu, J., Eriksson, S. E., Cebula, M., Sandalova, T., Hedström, E., Pader, I., Arnér, E. S. J. (2015). The conserved Trp114 residue of thioredoxin reductase 1 has a redox sensor-like function triggering oligomerization and crosslinking upon oxidative stress related to cell death. *Cell Death & Disease*, 6(1), e1616–. <http://doi.org/10.1038/cddis.2014.574>
- Yang, X., e Ma, K. (2010). Characterization of a Thioredoxin-Thioredoxin Reductase System from the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima*. *Journal of Bacteriology*, 192(5), 1370–1376. <http://doi.org/10.1128/JB.01035-09>
- Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Dominguez, Y., e Scazzocchio, C. (2004) Double-joint PCR: A PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 41(11), 973–981. doi:10.1016/j.fgb.2004.08.001
- Zaragoza, O., Rocio, G. R., Nosanchuk, J. D., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J. L., e Casadevall, A. (2010) Fungal cell gigantism during mammalian infection. *PLoS Pathogens*, 6(6). doi:10.1371/journal.ppat.1000945
- Zaragoza, O., Rodrigues, M. L., De Jesus, M., Frases, S., Dadachova, E., e Casadevall, A. (2009) The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol*, 68, 133–216. doi:10.1016/s0065-2164(09)01204-0
- Zhang, Z., Bao, R., Zhang, Y., Yu, J., Zhou, C. Z., e Chen, Y. (2009) Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* cytoplasmic thioredoxin reductase Trr1 reveals the structural basis for species-specific recognition of thioredoxin. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1794(1), 124–128. doi:10.1016/j.bbapap.2008.09.011
- Zhu Z., Labbe S., Pena M.M., Thiele D.J. (1998) Copper differentially regulates the activity and degradation of yeast Mac1 transcription factor. *J Biol Chem*. 273:1277–1280

ANEXOS

1*- Anexo A, figuras não incluídas no artigo

Anexo A. Cristais de *CnTrx1* obtidos utilizando os kits de cristalização

Na preparação do *screening* com a proteína *CnTrx1*, as gotas foram montadas utilizando volumes iguais de 2 μ L de proteína e 2 μ L da solução do precipitante (poço). Algumas das condições testadas obtiveram sucesso na formação de cristais nas condições: N° 32 (2 M *Ammonium sulfate*) e n°16 (0,1 M *HEPES sodium* pH 7,5 + 1,5 M *lithium sulfate monohydrate*) do Screen I da Hampton Research, pelo método de difusão de vapor em gota sentada. Após análise mais criteriosa dos cristais, feita por meio de verificação em microscópio óptico e coramento do cristal com Izit Crystal Dye™ (**Figura 1Sa**), foi efetuada a otimização das condições descritas acima, através do refinamento que incluiu variações no pH, variação da concentração do agente precipitante, do sal, da proteína e do pH do tampão.

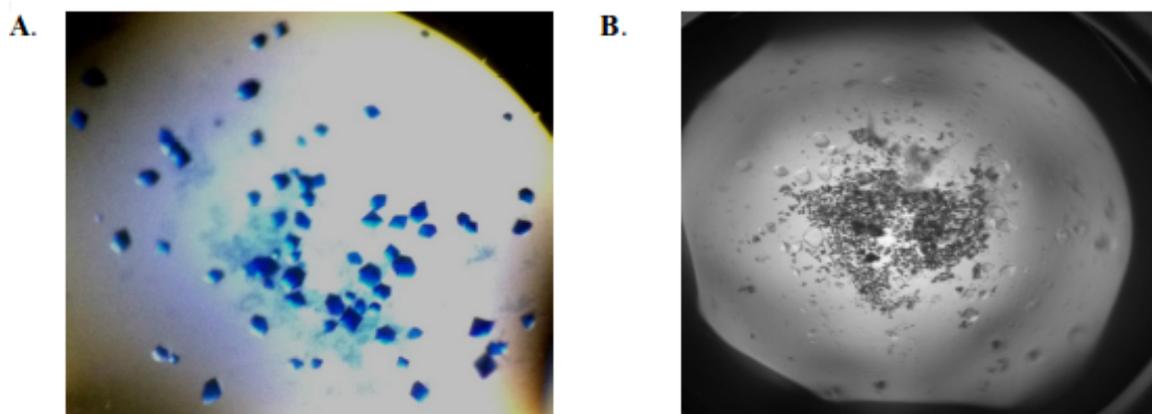


Figura 1S. Fotomicrografia do crescimento dos cristais da proteína recombinante Trx1 do fungo patogênico *C. neoformans*. (A) Condição n°32: Sulfato de amônio 2 M. Cristais de Trx1 corados com Izit Crystal Dye (proteína concentrada a 9 mg/mL). Cristais obtidos pelo método de difusão de vapor em gota suspensa. **(B)** Condição n°16: 0,1 M de HEPES sódio pH 7,5 e 1,5 M de sulfato de lítio monohidratado (proteína concentrada a 15,26 mg/mL), cristais obtidos pelo método de difusão em gota sentada.

A otimização da condição n°32, incluiu variação do tampão na faixa de tamponamento de pH 7,6 a 8,5. A concentração do agente precipitante foi variada na faixa de 1,5 a 2,2 M de sulfato de amônio. O experimento de refinamento da *CnTrx1* foi feito com a proteína em uma concentração de 9 mg/mL, aparecendo cristais nas seguintes condições: Placa 1, C1: Tris HCl 0,02 M pH 7,9 + 1,5 M de sulfato de amônio, com dimensões aproximadas (5x) de 224 microns horizontal, 196 microns comprimento, 106 microns lado (**Figura 2SA**). C5: Tris HCl 0,02 M pH 7,9 + 1,9 M de sulfato de

amônio, dimensões dos cristais (5x) foi: 245 micras horizontal, 194 micras comprimento, 122 micras lado (**Figura 2SB**). Placa 2, A2: Tris HCl 0,02 M pH 8,3 + 1,6 M de sulfato de amônio (tamanho dos cristais aproximado de 336 microns horizontal, 235 microns comprimento, 119 microns lado) (**Figura 2SC**). A3: Tris HCl 0,02 M pH 8,3 + 1,7 M de sulfato de amônio (tamanho dos cristais: 124 microns horizontal, 106 microns comprimento, 57 microns lado) (**Figura 2SD**). A6: Tris HCl 0,02 M pH 8,3 + 2 M de sulfato de amônio (tamanho dos cristais: 230 microns horizontal, 218 microns comprimento, 101 microns lado) (**Figura 2SE**) e B6: Tris HCl 0,02 M pH 8,5 + 2 M de sulfato de amônio (tamanho dos cristais 198 microns horizontal, 190 microns comprimento, 96 microns lado) (**Figura 2SF**). Placa 3, A2: Tris HCl 0,02 M pH 7,7 + 1,6 M de sulfato de amônio (380 microns horizontal, 327 microns comprimento, 207 microns lado) (**Figura 2SG**). A3: Tris HCl 0,02 M pH 7,7 + 1,7 M de sulfato de amônio (dimensões de 228 microns horizontal, 213 microns comprimento, 101 microns lado) (**Figura 2SH**). A4: Tris HCl 0,02 M pH 7,7 + 1,8 M de sulfato de amônio (132 microns horizontal, 98 microns comprimento, 49 microns lado) (**Figura 2SI**). B6: Tris HCl 0,02 M pH 7,8 + 2 M de sulfato de amônio (466 microns horizontal, 371 micras comprimento, 236 microns lado) (**Figura 2SJ**). C6: Tris HCl 0,02 M pH 7,9 + 2 M de sulfato de amônio (488 microns horizontal, 416 microns comprimento, 256 microns lado) (**Figura 2SK**). Placa 4, B6: Tris HCl 0,02 M pH 8,5 + 2 M de sulfato de amônio (304 microns horizontal, 264 microns comprimento, 147 microns lado) (**Figura 2SL**). Nas últimas duas placas foi usado o método do *seeding*, passando com um fio de nylon o cristal triturado sobre novas gotas. Em vários poços destas placas apareceram múltiplos cristais em forma de agulha. É possível que a variedade de condições onde foram encontrados os cristais, esteja associado ao grau de pureza da amostra de proteína que foi comprovado no padrão de bandas encontrado na eletroforese em gel de poliacrilamida 15%.

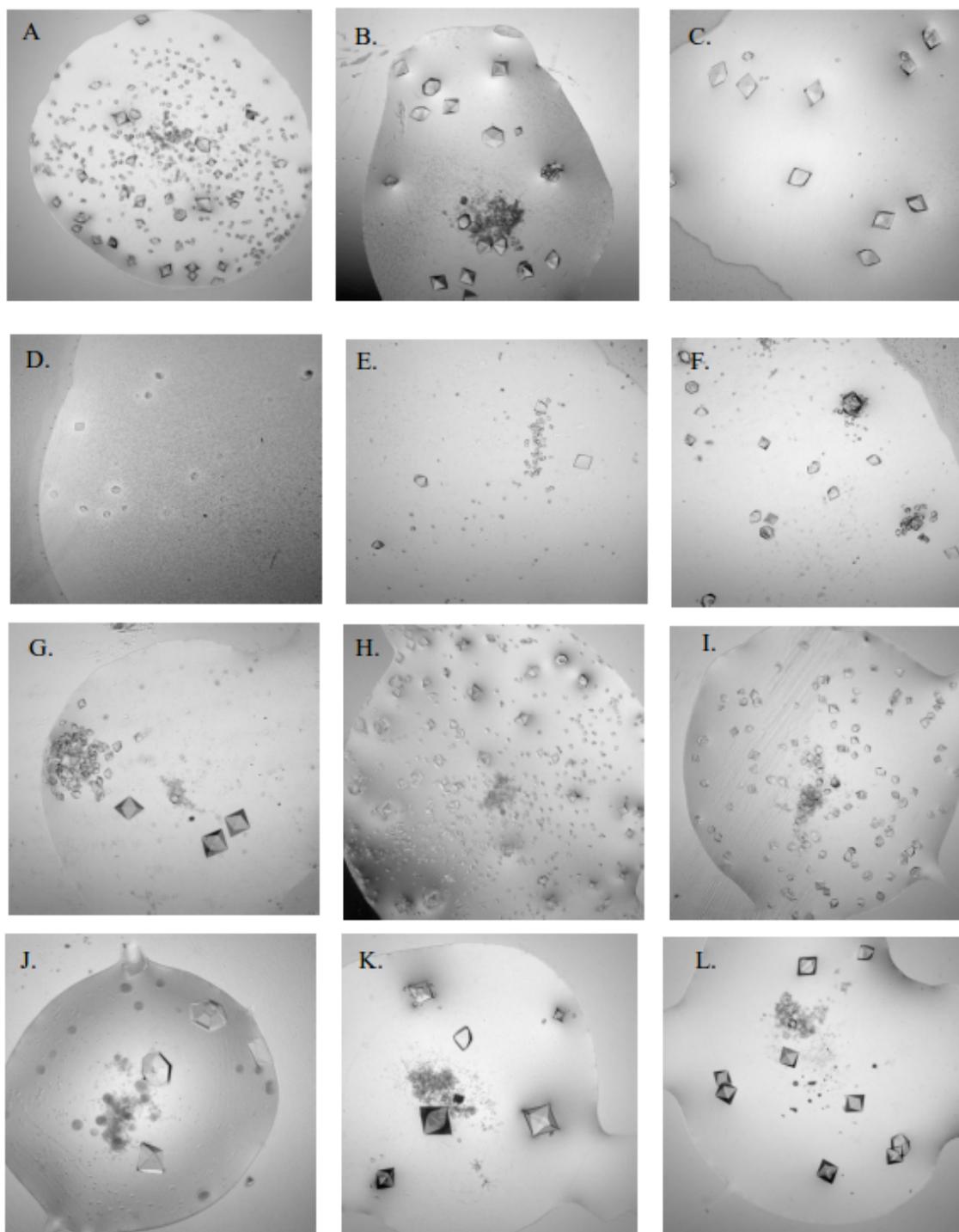


Figura 2S. Fotomicrografia das condições de refinamento da proteína recombinante Trx1 de *C. neoformans*, a partir da condição nº32 do kit I Crystal Screen da Hampton Research.

Anexo B.

Tabela 4. Dados obtidos através de DLS das frações provenientes da purificação de *CnTrr1*

Fração (amostra_Trr)	Distribuição	Tamanho (r.nm)	Pd (%)	Intensidade (%)	Massa (%)	Pico polidispersão
(0,10 mg/mL) + tampão citrato de sódio pH 5,0	Pico 1	32,63	11,7	18,2	22,6	Monodispersa
	Pico 2	229,7	15,2	81,8	77,4	Monodispersa
(0,10 mg/mL) + tampão tris pH 6,0	Pico 1	28,24	4,4	6,8	100,0	Monodispersa
	Pico 2	327,0	7,0	93,2	0,0	Monodispersa
(0,15 mg/mL) + tampão tris pH 7,0	Pico 1	206,2	3,1	100,0	51,2	Monodispersa
	Pico 2		0	0,0	0,0	
(0,16 mg/mL) + tampão tris pH 7,5	Pico 1	22,0	5,6	8,3	32,9	Monodispersa
	Pico 2	221,2	9,8	91,7	67,1	Monodispersa
(0,20 mg/mL) + tampão tris pH 8,0	Pico 1	33,5	7,9	12,6	68,0	Monodispersa
	Pico 2	201,4	12,1	87,4	32,0	Monodispersa
(0,12 mg/mL) + tampão tris pH 8,5	Pico 1	17,01	4,4	6,0	49,7	Monodispersa
	Pico 2	126,3	6,5	94,0	50,3	Monodispersa
(0,13 mg/mL) + tampão tris pH 9,0	Pico 1	30,08	14,1	25,6	100,0	Monodispersa
	Pico 2	166,9	9,2	84,4	0,0	Monodispersa
Trr1 + NADPH (4mg) – tris pH 8,0	Pico 1	29,08	10,9	20,9	59,0	Monodispersa
	Pico 2	207,0	15,2	79,1	41,0	Monodispersa

r.nm raio hidrodinâmico, **Pd** polidispersividade.

Essa técnica é útil para informar sobre a polidispersidade de uma amostra, já que é sensível à agregação e conseqüentemente, tentar prever uma melhor capacidade de formar cristais. Isso ocorre porque observações empíricas sugerem que macromoléculas monodispersas (com todas as partículas do mesmo tamanho), sob condições normais de solvente, cristalizam mais facilmente (D'Amar e Burley, 1994).

Anexo C. Cristalização de *CnTrr1*

A observação de material cristalino em alguma das condições, mesmo que de tamanho e morfologia inadequados, era ponto de partida para que monocristais apropriados aos experimentos de difração de raios X foram obtidos. Crescimento de pequenos cristais em agulha e pequenos bastões (**Figura 21A**) foram observados nas seguintes condições quando a proteína foi concentrada em 11 mg/mL:

Kit 1:

condição nº4 : 0,1 M tris-HCl pH 8,5 + 2,0 M sulfato de amônio
condição nº16: 0,1 M hepes sódio pH 7,5 + 1,5 M sulfato de lítio monohidratado
condição nº17: 0,2 M sulfato de lítio monohidratado + 0,1M tris-HCl pH 8,5 + 30% w/v PEG 4000
condição nº19: 0,2 M acetato de amônio + 0,1M tris-HCl pH 8,5 + 30% v/v 2-propanol
condição nº23: 0,2 M cloreto de magnésio hexahidratado + 0,1 M hepes sódio pH 7,5 + 30% v/v PEG 400

Kit 2:

condição nº16: 0,5 M cloreto de sódio + 0,1M citrato de sódio tribásico pH 5,6 + 2% v/v *Polímero de etileno imina*
condição nº24: 0,05 M cloreto de cézio + 0,1 M MES monohidrato pH 6,5 + 30% v/v *jeffamine M-600*
condição nº27: 0,01 M sulfato de zinco heptahidratado + 0,1M MES monohidrato pH 6,5 + 25% v/v PEG monoetil eter 550
condição nº42: 1,5 M sulfato de amônio + 0,1 M tris-HCl pH 8,5 + 12% v/v glicerol

A condição nº34: 0,05 M sulfato de cádmio + 0,1 M hepes sódio pH 7,5 + 1,0 M acetato de sódio trihidratado, apresentou formação de cristais ovais irregulares, que foram confirmados pela coração com o Izit (**Figura 21B**).

Para cada uma das condições mencionadas, ensaios de refinamento foram realizados na proteína *CnTrr1* nas concentrações de 28 mg/mL até 35 mg/mL. A otimização dessas condições baseou se na variação do tipo e concentração de sal, além de variação do pH e concentração de PEGs. Assim, cristais em forma de *placa* foram observados quando a proteína foi concentrada a 35 mg/mL com adição de 20 µM de FAD, na condição de refinamento contendo: 0,2 M sulfato de amônio + 0,1 M cacodilato de sódio (na faixa de pH 6.4 -6.6) + 28 - 32% w/w PEG 8000 (**Figura 21C**).

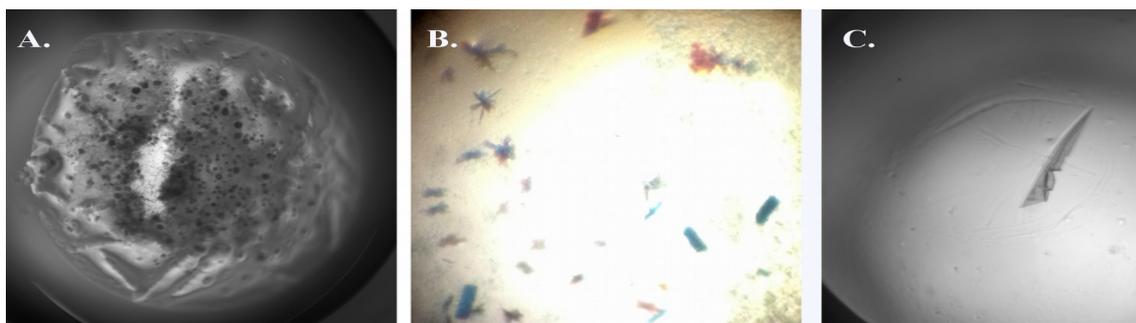


Figura 21. Fotomicrografia do crescimento dos cristais da proteína recombinante *CnTrr1*. Condições de cristalização selecionadas para o refinamento. **(A)** *CnTrr1* condição nº34 do kit *Crystal Screen II*, com obtenção de pequenos cristais na forma oval. **(B)** *CnTrr1* condição nº42 do kit *Crystal Screen II*, com obtenção de pequenos cristais na forma de agulhas e bastões. Cristais corados com o Izit Crystal Dye. **(C)** *CnTrr1* condição nº15 do kit *Crystal Screen I*, com obtenção de cristais em forma de placas superpostas, a proteína foi concentrada a 35mg/mL.

Anexo D.

Teste da atividade citotóxica da molécula 3 em macrófagos murinos

Após os animais receber injeções intraperitoneais de tioglicolato a 4% e permanecerem no biotério por 4 dias, as células recolhidas foram centrifugadas a $300 \times g$ por 5 min na temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi dispensado e o pellet ressuscitado no mesmo tipo de meio usado para coletá-las. Esse procedimento foi realizado mais duas vezes, porém, na ultima vez, as células foram ressuscitadas em meio RPMI-1640 suplementado com bicarbonato de sódio e 2% de soro fetal bovino (SFB). Em 10 μL dessa mistura foi adicionada a mesma quantidade do corante azul de Tripán e foi feita a contagem das células no hemocitômetro. A concentração da suspensão foi ajustada para 4×10^6 células/mL, para que houvesse 2×10^5 células/poço, na placa de 96 poços. Esta, foi armazenada em uma estufa úmida a 37 °C, por 24 h, para que as células pudessem se aderir à placa. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e as células aderidas foram consideradas macrófagos. Foram adicionados, então, 50 μL de meio de cultura suplementados com 2% de SFB em cada um dos poços.

A molécula foi diluída da mesma maneira feita para os testes de atividade hemolítica e cada poço recebeu 50 μL da molécula na concentração desejada. A placa retornou à estufa por mais 24 h.

Após esse período de incubação, parte do sobrenadante foi retirado. A verificação da viabilidade celular foi feita por meio da dosagem da enzima citoplasmática lactato desidrogenase (LDH), que é liberada no meio extracelular apenas quando há ruptura da membrana plasmática, com o kit Cytotox 96® (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, foram recolhidos 50 μL de cada poço e transferidos para uma placa de 96 poços, de fundo chato e 50 μL do substrato foi adicionado em cada poço. Após 30 min, colocou-se 50 μL da solução de parada e foi feita a leitura em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. Como a coloração observada é proporcional à quantidade de células lisadas,

O percentual de viabilidade foi gerado a partir da fórmula (Eq. 16):

$$\% \text{ Citotoxicidade} = (\text{DOs}) / (\text{DO}_{100}) \times 100 \quad (\text{Eq. 16})$$

sendo “DOs” a densidade óptica da amostra e “DO₁₀₀” a densidade óptica do controle positivo para a viabilidade celular (células não estimuladas, viáveis).

Anexo E.

Teste de citotoxicidade e ensaio *in vivo* utilizando o modelo experimental de Criptococose

Esses resultados foram realizados pela Doutora Erika S. Kioshima que faz parte do projeto de pesquisa maior: “Pós-genoma de fungos patogênicos humanos visando o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas” sobre a coordenação da Profa. Dra. Maria Sueli. Todos os dados mostrados ainda não foram publicados, mas os autores autorizam a divulgação dos resultados.

Metodologia

Teste de Citotoxicidade *in vitro*

A ação citotóxica das *small molecules* foi investigada através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTS (3-[4,5-dimethylthiazol- 2-yl]- 5-[3- carboxymethoxyphenyl]-2- [4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium) (Promega, Madison, WI). Esse ensaio visou quantificar as células viáveis que são capazes de metabolizar o MTS a um composto denominado formazan e, assim, obter informações sobre a citotoxicidade. Para estes ensaios, as células HeLa foram incubadas em placas de cultura de fundo chato de 96 poços, mantidos em DMEM (Meio Dulbecco Modificado por Eagle) com 5% de soro fetal bovino completo, e tratadas a diferentes concentrações das substâncias a serem testadas. Estas células permaneceram em exposição por 24 horas e após esse período, foram adicionados solução de MTS à cada poço e incubada por 180 min. em estufa de CO₂ (5%) a 37 °C. A viabilidade celular foi determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de 490 nm. A citotoxicidade dos compostos será apresentada como a média de três experimentos independentes com três réplicas para cada composto e concentração. As porcentagens de viabilidade celular foram calculadas em relação aos controles celulares.

Ensaio *in vivo* utilizando o modelo experimental de *Criptococose*

Aspectos Éticos

Foram utilizados Camundongos Balb/c com aproximadamente seis semanas de idade, criados nas instalações Animal da Universidade Estadual de Maringá, Brasil. É importante ressaltar, que o plano de trabalho deste projeto foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação desta Instituição, sob o número de protocolo nº160/2013. Os animais foram tratados de acordo com as recomendações descritas na resolução nº33 do CONCEA.

Ensaio *in vivo* utilizando o modelo experimental de *Criptococcose*

Os camundongos da linhagem Balb/c foram separados em 3 grupos: grupo de tratamento com a LMM5 (molécula 14), grupo de tratamento com anfotericina B e grupo controle (tratado com PBS). Uma suspensão em salina de 2×10^5 *Cryptococcus neoformans* foi inoculada na veia lateral da cauda e após 3 horas da infecção, iniciou-se o tratamento. O composto foi administrado a 5mgkg^{-1} e a anfotericina a 1mgkg^{-1} , 2x/dia durante 5 dias, pela via endovenosa.

Resultados

Ensaio de Citotoxicidade *in vitro* para a LMM5 (Mol_14).

A **Figura 1** demonstra os resultados da avaliação de toxicidade em células (*in vitro*) do composto selecionado (Mol_14) e o diluente (DMSO), em células HeLa em 24 horas. Como podemos observar, para LMM5 houve redução significativa da viabilidade celular na concentração de 256 $\mu\text{g/mL}$. O diluente (DMSO) não apresentou toxicidade significativa em nenhum dos parâmetros avaliados.

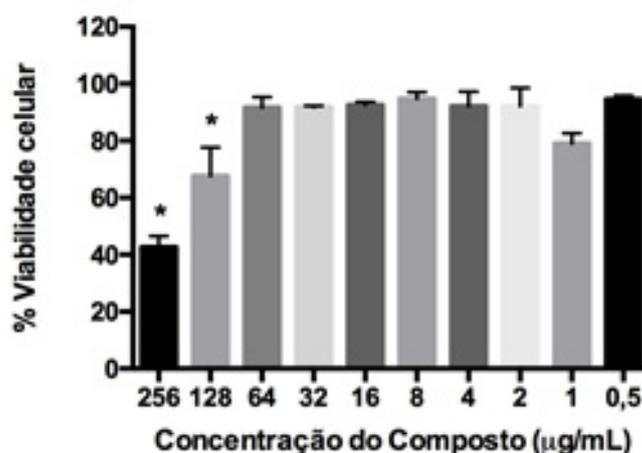


Figura 1. Citotoxicidade *in vitro* da molécula 14 sobre células *HeLa*. Mol_14 foi testada nas concentrações de 256 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$, e a viabilidade celular foi avaliada pela atividade mitocondrial das células utilizando o kit *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)*, após 24 horas de incubação. A porcentagem de células viáveis após a exposição da Mol_14 nas diferentes concentrações, foi avaliada considerando células sem tratamento como 100% de viabilidade. Os experimentos foram realizados em triplicata, e as barras indicam o desvio padrão. * $p < 0.05$, redução estatisticamente significativa quando comparado as outras concentrações.

Ensaio *in vivo* utilizando o modelo experimental de Criptococose.

Os resultados utilizando o modelo experimental *in vivo* de criptococose apontou que o composto LMM5 (Mol_14) não foi capaz de reduzir de maneira significativa a carga fúngica (UFC) nos órgãos alvos ($p < 0,05$) com relação ao controle, como mostrado na **Figura 2**.

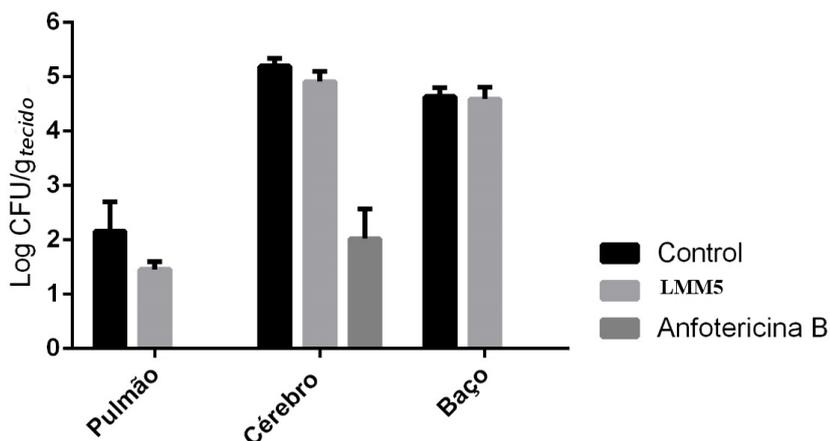


Figura 2. Criptococose Experimental. Atividade antifúngica *in vivo* do composto LMM5. Unidades Formadoras de Colônia (Log₁₀ UFC) do Cérebro, Pulmão e Baço infectado com *Cryptococcus neoformans*. Controle: animais tratados com diluente dos compostos. AnfoB: animais tratados com Anfotericina B 1mg/kg. LMM5: animais tratados com o composto LMM5 5mg/kg. Todos tratamentos foram realizados durante 5 dias. Os experimentos foram realizados em triplicata, e as barras indicam o desvio padrão. * $p < 0.05$, redução estatisticamente significante quando comparado com o controle.

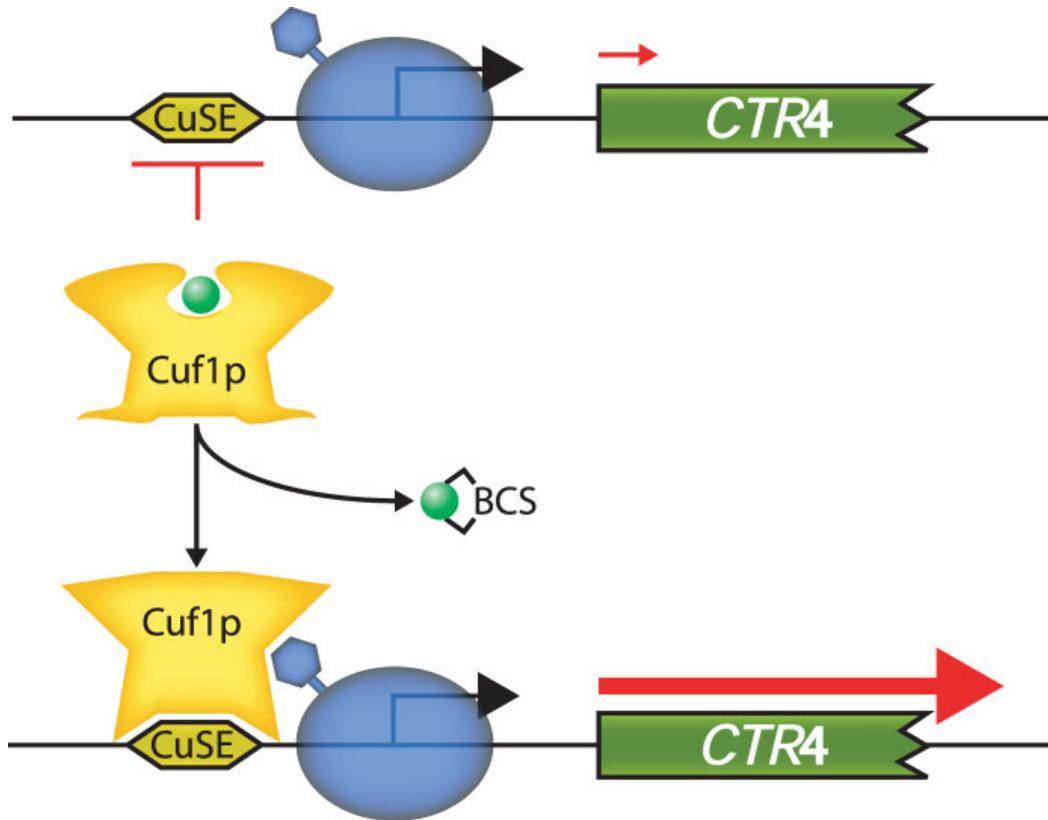
Anexo F. Tabela 14. Oligonucleotídeos utilizados no estudo de *TRR* em *C. neoformans*.

Primer	Descrição	Tipo	Sequência	Alvo	Uso
LF364	HygF-CTR4 5' hyg>>>>	F	CATGCAGGATTCGAGTGGC ATG	HYG	Dupla junta (Hyg-P _{CTR4}) Amplificar HYG de pPZPHPH
LF450	hygR 3' hyg<<<<	R	GGAGCCATGAAGATCCTGA GGA	HYG	Amplificar HYG de pPZPHPH
LF451	CTR4-F	F	ATATTGCTGTTTCTACAGAG GT	P _{CTR4}	Amplificar P _{CTR4} (Chayakulkeeree <i>et al.</i> , 2007)
LF452	Novo CTR4.2R	R	ATGGATTGGTGAAGTCGTT GTCC	P _{CTR4}	Dupla junta (Hyg-P _{CTR4}) Amplificar P _{CTR4}
LF366	Trr15UTRFCTR 4	F	GTTGATAGAATGCATGGCA GCGAGGGCAA	TRR	Dupla junta (P _{CTR4} -TRR)
LF367	HygR- Trr15UTRR2	R	CACTCGAATCCTGCATGGG CGCTAACTTCTT	TRR	Dupla junta (P _{CTR4} -TRR)
	NSL_hph-LF28	R	CTGACCTATTGCATCTCCCG C	P _{CTR4}	Dupla junta (para Hyg-P _{CTR4})
	NSR_hph -LF29	F	AGCTCTCGGAGGGCGAAGA AT	P _{CTR4}	Dupla junta (para Hyg-P _{CTR4})
LF481	TRRORF-NewB	F	ATGTCTCCCATCGCAA	TRR	Dupla junta (P _{CTR4} -TRR)
LF453	Novo CTR4- TRRORFR	R	GAGCTCGGAATTATCCATC	TRR	Dupla junta (P _{CTR4} -TRR)
LF370	TRR5UTRFchk	F	GGTATCATGATCTTTCTCGG	TRR	Confirmação da integração do cassete
LF379	TRR3UTRRchk R	R	GATATCAATGACGAGTGC	TRR	Confirmação da integração do cassete
LF371	mCherryFtagg	F	ATGGTGAGCAAGGGCGAG	pCN51	Dupla junta (para pCN51)
LF372	NatmCherrytagg R	R	CCTAAGAATTCGTGAAGGC G	pCN51	Dupla junta (para pCN51)
LF373	NatmCherryF	F	GTTGTCTGTAGATAGATTAA TG	pCN51	Dupla junta (para pCN51)
LF374	NatmCherryR	R	CCTTGAATAGAGTCACTTTT G	pCN51	Dupla junta (para pCN51)
LF375	Trr1mCherryF	F	GCTGATAGGTTATGTCAGAC CTCACCAAGTA	TRR	Dupla junta (para pCN51-TRR)
LF376	TrrMcherryR	R	CTCGCCCTTGCTCACCATCT CCTTGTCAGTGC	TRR	Dupla junta (para pCN51-TRR)
LF377	McherryTrr3UT RF	F	CAAAAAGTGA CTATTCAA GG GAAGAGAGGTCAAA	TRR	Dupla junta (para pCN51-TRR)
LF378	McherryTrr3UT RR	R	GGAATAAGAGGACAGATGA CGA	TRR	Dupla junta (para pCN51-TRR)
LF380	NATMcherryFC hk	F	GCACCTAGCACCCATG	pCN51	Confirmação da integração do cassete mcherry

F, Forward; R, Reverse

Anexo G.

Promotor regulado em *C. neoformans* usando o promotor CTR4



Esquema da transcrição mediada por Cuf1p. A pequena esfera verde associada com Cuf1p representa o cobre, e a forma azul representa a maquinaria de transcrição. BCS: Ácido batocuproinedisulfônico. Fonte: adaptado de: Ory *et al.*, (2004).

Anexo H.

Caracterização funcional de Rad53 de Cryptococcus neoformans

Em 2010, da Silva Dantas e cols. revelaram que a quinase de checkpoint Rad53 em células *trx1Δ* de *C. albicans* é hiperativada em resposta ao H₂O₂ e é essencial para o crescimento polarizado induzido pelo H₂O₂. Embora a Trx1 regula a principal resposta ao estresse oxidativo através das vias Cap1 e Hog1, os dados demonstraram que nenhuma dessas vias está envolvida no crescimento celular polarizado em *C. albicans*, no entanto, Rad53 desempenhava um papel central na mediação de crescimento celular polarizado em resposta aos insultos genotóxicos (HU e MMS). Dantas e cols., revelaram que os mutantes *rad53Δ* são importantes para a resposta celular às ROS, demonstrado pelo aumento da sensibilidade das células ao H₂O₂ 5mM. A análise de *western-blot* evidenciou que, Rad53 torna-se hiperfosforilada em resposta ao H₂O₂, e significativamente hiperfosforilada em células *trx1Δ* sobre condições de estresse. Concluindo que, a exposição celular ao H₂O₂ e a inativação de Trx1, sugere fortemente a ativação da Rad53 *checkpoint* (da Silva Dantas *et al.*, 2010).

A partir desses resultados, surgiu uma colaboração com a Dra. Alessandra Dantas, com o intuito de revelar o papel de Rad53 em *C. neoformans* e sua interação com o gene essencial *TRR1*. As buscas no PubMed até o ano 2016, revelavam que não existia nenhum estudo de Rad53 em *C. neoformans*. Especificamente os estudos avaliavam a funcionalidade desse gene no fungo *C. albicans* e nas leveduras *S. cerevisiae* e *S. pombe*. (Cartagena-Lirola *et al.*, 2008; Tanaka e Russell, 2004). Sendo assim, como *RAD53* é um gene que traduz uma proteína que é regulada por Trx1 em *C. albicans*, e como este gene faz parte do sistema tioredoxina que tem um papel central na virulência de *C. neoformans*, o gene *RAD53* foi deletado e os fenótipos caracterizados pelos testes de viabilidade celular e resistência ao estresse oxidativo e estresse genotóxico. Uma vez que a Trx1 regula a função de Trx1, espera-se que Trx1 e Trx1 regulem a atividade do mesmo conjunto de proteínas (neste caso o Rad53), sendo assim a deleção de *TRR1* ou *TRX1*, resultariam em fenótipos similares. Entretanto, sabe-se que em *C. neoformans* deleção de *TRR1* resulta na perda de viabilidade enquanto mutantes *trx1Δ* apresentam um defeito grave de crescimento e são sensíveis a o estresse oxidativo (Missal e Lodge 2005).

Estudos preliminares mostraram que ao contrário dos resultados obtidos em *C. albicans*, *Δrad53* em *C. neoformans* não apresentou defeito de crescimento em relação à alta temperatura, estresse oxidativo (H₂O₂) e estresse osmótico (KCl, NaCl), mas, a cápsula foi observada diminuída em comparação com a cepa do tipo selvagem. Devido à magnitude dos experimentos, os estudos em Rad53 foram conduzidos pela Profa. Larissa Fernandes Matos e a sua estudante de graduação Narla

Verorrayne Gonçalo Pimentel que deram continuidade aos testes genotóxicos e de virulência. O trabalho resultante foi apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso em junho de 2017 e na modalidade de pôster no congresso “10th *International conference on Cryptococcus and Cryptococcosis*”, Foz do Iguaçu, Brasil, 2017, os quais fui colaboradora:

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY POSTER PRESENTATIONS



Gmb7 - Role of the Rad53 in response to genotoxic stress in *Cryptococcus neoformans*

Narla Verorrayne Gonçalo Pimentel^{1,a}, Claudia Bravo-Chaucanés^{1,a}, Alessandra da Silva Dantas², Raffael Junio Araujo de Castro¹, Anamélia Lorenzetti Bocca¹, Maria SS Felipe¹, Larissa Fernandes^{1*},
¹University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil, ²University of Aberdeen, Foresterhill, Aberdeen, UK.

Rad53 is a eukaryote conserved protein kinase that is phosphorylated and activated in response to DNA damage. When the events of the cell cycle are disrupted, the checkpoint proteins block the cell cycle progression until DNA repair process is completed. In *Saccharomyces cerevisiae*, Rad53 plays important roles in the G1, S, and G2 phases of the cell cycle, mediates most of the responses after DNA damage and is involved in tolerance to UV exposure. In this work, we show the preliminary data related to the Rad53 functional characterization in *C. neoformans*. It is not an essential gene, as the mutant *rad53Δ* was obtained by homologous recombination of Hygromycin B resistance marker (HPH). Integration of the HPH marker into the RAD53 locus was confirmed by PCR and Southern blot. The mutant did not display any growth defect in regard to high temperature, oxidative stress (H₂O₂ and menadione), osmotic stress (KCl, NaCl) and cell wall stress (Congo Red and Calcofluor white). We also evaluated the production of virulence factors in *rad53Δ*, urease, phospholipase, melanin and capsule. Only capsule was decreased when compared to the wild type strain. The response of *rad53Δ* to genotoxic insults, including hydroxyurea (HU) which inhibits DNA synthesis, methylmethane sulfonate (MMS) that disrupts cell cycle due to DNA alkylation and UV radiation, were also evaluated. The mutant Δ rad53 showed a growth defect at 0.04% of MMS, at 150 and 200 mM of HU and after exposition to UV radiation (60-360 J/m²) as compared to the wild type. Faced with the absence of data related to the functionality of Rad53 in *C. neoformans*, these results suggest that it plays an important role in the cell cycle regulation in response to genotoxic stress.