

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Caracterização funcional de And1 como potencial componente da via de sinalização de Ca²⁺/calcineurina em *Cryptococcus neoformans*

Dissertação de Mestrado

Bárbara Machado Marques

Porto Alegre, fevereiro de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Caracterização funcional de And1 como potencial componente da via de sinalização de Ca²⁺/calcineurina em *Cryptococcus neoformans*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Bárbara Machado Marques

Orientadora: Prof^a Dra. Livia Kmetzsch Rosa e Silva

Porto Alegre, fevereiro de 2019

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Agradecimentos

Aos meus pais Olício e Elisângela e minha irmã Bibiana, que por meio do seu suporte incondicional, sempre proporcionaram as melhores condições para que eu pudesse completar a minha formação acadêmica. Por todo o amor e carinho que vocês sempre me acolhem. E aos meus tios Dina e Luís Armando, pelo incentivo e conselhos ao longo desses anos.

Ao meu namorado Daniel, que foi essencial em todas as etapas do meu mestrado, sempre ouvindo pacientemente minhas inseguranças e frustrações, abrindo os meus olhos para o lado positivo das coisas. Por me incentivar a continuar, quando eu já queria desistir. Por ser meu companheiro na ciência e na vida.

À minha orientadora Prof^a Dra. Lívia Kmetzsch, por me receber em seu grupo de pesquisa de braços abertos, estando sempre disposta a ajudar e tirar dúvidas. Por toda a compreensão e apoio emocional nos momentos mais difíceis. E ao Prof^o Dr. Charley Staats, que sempre se disponibilizou em resolver qualquer dificuldade ao longo do desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus colegas de laboratório e amigos para a vida, Heryk, Natália, Ane, Camila e Uriel, por me proporcionarem um ambiente divertido e de discussão científica, que muitas vezes ajudou a superar as dificuldades no trabalho. Em especial à Júlia e a Eamim, que pacientemente transmitiram a mim todo seu conhecimento, em relação à execução das técnicas e resolução de problemas.

Às minhas amigas de infância Gabriela, Letícia, Maria Eduarda e Julia Grando. Que me acompanharam e me incentivaram ao longo desta jornada. Especialmente à Julia Toscan, por me ajudar a superar todas as dificuldades; e à Bruna, que gentilmente ofereceu sua ajuda na edição das figuras.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho, muito obrigada.

Sumário

Lista de Abreviaturas	V
Lista de Figuras	VI
Resumo	VII
Abstract	IX
1. Introdução	1
1.1. <i>Cryptococcus neoformans</i> : agente etiológico da criptococose.....	1
1.2. Mecanismos de sobrevivência e proliferação de <i>C. neoformans</i>	2
1.2.1. <i>Estratégias de transmigração pela BHE</i>	2
1.2.2. <i>Determinantes de virulência</i>	4
1.3. A Parede celular de <i>C. neoformans</i>	6
1.3.1. <i>Estrutura e composição</i>	6
1.3.2. <i>Reguladores da integridade da parede celular</i>	8
1.4. Regulação da homeostase de Ca ²⁺ mediada pela via da calcineurina	11
2. Objetivos	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. Resultados	16
4. Discussão	42
5. Conclusões	45
6. Perspectivas	45
7. Referências	46

Lista de Abreviaturas

- BBB: barreira hematoencefálica, do inglês *blood-brain barrier*
- BHE: barreira hematoencefálica
- CFU: unidades formadoras de colônia, do inglês *colony-forming units*,
- CFW: Calcofluor White
- CNS: sistema nervoso central, do inglês *central nervous system*
- CWI: integridade de parede celular, do inglês *cell wall integrity*
- cDNA: DNA complementar
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- GalXM: galactoxilomanana
- GDP: guanosina difosfato
- GEF: fatores de troca de nucleotídeos guanina, do inglês *guanine nucleotide exchange factors*
- GTP: guanosina trifosfato
- GXM: glucoronoxilomanana
- HIV: vírus da imunodeficiência humana
- IPC: integridade da parede celular
- IPR: taxa de proliferação intracelular, do inglês *intracellular proliferation rate*
- MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno, do inglês *mitogen-activated protein kinase*
- NLS: sítio de localização nuclear, do inglês *nuclear localization site*
- NoLS: sítio de localização nucleolar, do inglês *nucleolar localization site*
- PCR: reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*
- PI: índice de fagocitose, do inglês *phagocytosis index*
- RNA: ácido ribonucleico
- RNA-seq: sequenciamento de RNA
- RT-qPCR: transcrição reversa seguida de PCR quantitativo
- SLN: sítio de localização nuclear
- SLNo: sítio de localização nucleolar
- SNC: sistema nervoso central
- WT: linhagem selvagem, do inglês *wild type*

Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo de infecção de Cryptococcus.

Figura 2: Mecanismos de transmigração da BHE.

Figura 3: Organização estrutural da parede celular de *C. neoformans*

Figura 4: Camadas que compõe a parede celular.

Figura 5: Representação esquemática da via de sinalização da IPC.

Figura 6: Representação da via de sinalização Ca^{2+} -calcineurina em células de fungos.

Figura 7: Representação da sinalização de calcineurina-Crz1 em *Cryptococcus neoformans*.

Resumo

Cryptococcus neoformans é um patógeno oportunista, principal causa de infecções fúngicas que acometem pacientes imunocomprometidos. Esta levedura é capaz de colonizar o pulmão, disseminando-se para o tecido cerebral e causando um quadro de meningoencefalite criptocócica, frequentemente fatal. A sobrevivência de *C. neoformans* no hospedeiro é dependente do desenvolvimento de determinantes de virulência como crescimento a 37 °C, produção de cápsula polissacarídica e a produção de enzimas como urease e fosfolipase B1. Íons cálcio (Ca²⁺) são mensageiros intracelulares que participam da via de sinalização mediada por calcineurina, a qual é fundamental para a patogenicidade de *C. neoformans*. Transportadores vacuolares de Ca²⁺, como Pmc1, coordenam a regulação dos níveis de Ca²⁺ intracelulares. Foi demonstrado que Pmc1 é necessário para a virulência desta levedura, uma vez que linhagens contendo a deleção do gene *PMCI* (*pmc1Δ*) foram avirulentas em modelo murino de infecção. Dados transcricionais prévios indicam que deleção de *PMCI* desencadeia alterações na expressão de genes associados com mecanismos de disseminação cerebral e genes envolvidos com a via da calcineurina. No intuito de identificar possíveis reguladores ou alvos de calcineurina, genes cuja expressão é modulada pela deleção de *PMCI* foram selecionados. A seleção foi restrita apenas à proteínas que continham assinatura de proteínas ligadoras de DNA. Análises por RT-qPCR demonstraram que o gene *CNAG_03913* apresenta níveis de expressão significativamente aumentados em *pmc1Δ* na presença de FK506, sugerindo o envolvimento deste gene na via de sinalização de Ca²⁺/calcineurina. Análises *in silico* revelaram a presença do domínio *ANI-like zinc finger*, sendo então o referido gene denominado *AND1* (*ANI-like zinc finger containing domain*). Para caracterizar funcionalmente o papel do gene *AND1* na regulação da homeostase de Ca²⁺ em *C. neoformans*, linhagens mutante (*and1Δ*) e complementada (*and1::AND1*) foram construídas. Análises fenotípicas das linhagens mutantes indicaram possíveis alterações na parede celular. Células contendo a deleção de *AND1* foram hipersensíveis ao crescimento em estresse de parede (Congo red) sob choque hiposmótico (meio YPD 0,5X), sugerindo uma relação com vias de manutenção da osmolaridade em *C. neoformans*. Além disto, análises de RT-qPCR indicaram diferenças significativas na expressão de genes codificadores de quitina sintases *CHS3*, *CHS5* e *CHS8*, quitinase *CHI22* e de *PKC1* no mutante *and1Δ*, os quais podem ser correlacionados ao fenótipo de hipersensibilidade ao

agente estressor de parede celular Congo red. Estes dados sugerem um possível envolvimento de And1 com a regulação da parede celular de *C. neoformans*.

Abstract

Cryptococcus neoformans is an opportunistic pathogen and the main cause of fungal infections related to death in immunocompromised patients. This yeast is able to disseminate from the lungs to the central nervous system, resulting in often fatal cryptococcal meningoencephalitis. The cryptococcal survival within the host requires a range of virulence determinants, such as growth at 37°C, development of a polysaccharide capsule and production of enzymes as urease and phospholipase B1. The cations calcium (Ca^{2+}) are cellular messengers that participates in calcineurin signaling, which is fundamental to cryptococcal virulence. Moreover, vacuolar Ca^{2+} transporters such as Pmc1, coordinate the regulation of Ca^{2+} intracellular levels. It has been shown that Pmc1 is required for proper virulence of *C. neoformans* since the mutant strain lacking the *PMCI* gene (*pmc1* Δ) was avirulent in mice infection model. Previous transcriptome data indicate that the disruption of *PMCI* gene leads to alterations in the expression level of genes involved with cerebral dissemination and genes that participate of the calcineurin signaling pathway. Aiming to identify possible calcineurin regulators or targets, genes whose expression is modulated by the absence of *PMC*, were selected. Besides, this selection was limited to proteins containing signatures of DNA binding-proteins. RT-qPCR analysis revealed that the *CNAG_03913* gene is highly expressed on *pmc1* Δ in the presence of FK506, suggesting a participation in the Ca^{2+} /calcineurin signaling pathway. *In silico* analysis revealed the presence of AN1-like zinc finger domain, thus this gene was named *AND1* (AN1-like zinc finger containing domain). To functionally characterize the role of *AND1* gene in *C. neoformans* calcium homeostasis, a null mutant strain (*and1* Δ) and a complemented strain (*and1::AND1*) were constructed. Phenotypic analysis of the mutant strains indicated alterations in the yeast's cell wall. Cells lacking *AND1* were hypersensitive of cell wall stress (Congo red) upon hypoosmotic shock (YPD 0.5X), which then suggest a crosstalk with osmolarity maintenance pathways in *C. neoformans*. Moreover, RT-qPCR analysis demonstrated significant differences on the gene expression of genes that codes to chitin synthases *CHS3*, *CHS5* and *CHS8*, *CHI22* chitinase and *PKCI* genes in the mutant *and1* Δ , which could be related to the hypersensitivity to the cell wall stressor agent Congo red. In this way, the data suggests a possible involvement of And1 with the cell wall maintenance regulation.

1. Introdução

1.1. *Cryptococcus neoformans*: agente etiológico da criptococose

Cryptococcus neoformans é um fungo leveduriforme do filo Basidiomycota, caracterizado como principal agente da meningite criptocócica em pacientes imunocomprometidos. Os casos de criptococose estão distribuídos mundialmente, havendo maior ocorrência na África Subsaariana, associada aos altos índices de pacientes HIV-positivos. A ocorrência de meningite criptocócica é estimada em uma incidência anual de 223.000 casos, levando à 181.000 mortes por ano (RAJASINGHAM et al., 2017a; THINYANE; MOTSEMME; COOPER, 2015). No Brasil, estima-se que a incidência de criptococose ocorre em torno de 1.000 a 2.500 casos por ano, sendo a principal causa de morte entre pacientes HIV-positivos brasileiros (PRADO et al., 2009; RAJASINGHAM et al., 2017a).

C. neoformans é uma levedura ambiental, sendo encontrada em excreta de pombos, na casca de algumas espécies de árvores ou em associação à amebas e insetos (LIN; HEITMAN, 2006; MAZIARZ; PERFECT; HEALTH, 2018). A infecção por *C. neoformans* é inicialmente estabelecida pela inalação de esporos desta levedura, provenientes do ambiente. Os esporos irão atingir os alvéolos pulmonares do hospedeiro, estabelecendo uma infecção assintomática em pacientes imunocompetentes. O fungo entra em estado de latência quando o sistema imune do hospedeiro está comprometido, causando nódulos pulmonares e inflamação dos pulmões. O progresso da infecção se caracteriza pela disseminação da levedura para a corrente sanguínea, transmigração da barreira hematoencefálica (BHE) e consequente colonização do tecido cerebral, causando um quadro de meningoencefalite fúngica (Figura 1) (SABIITI; MAY, 2012; TAYLOR-SMITH; MAY, 2016).

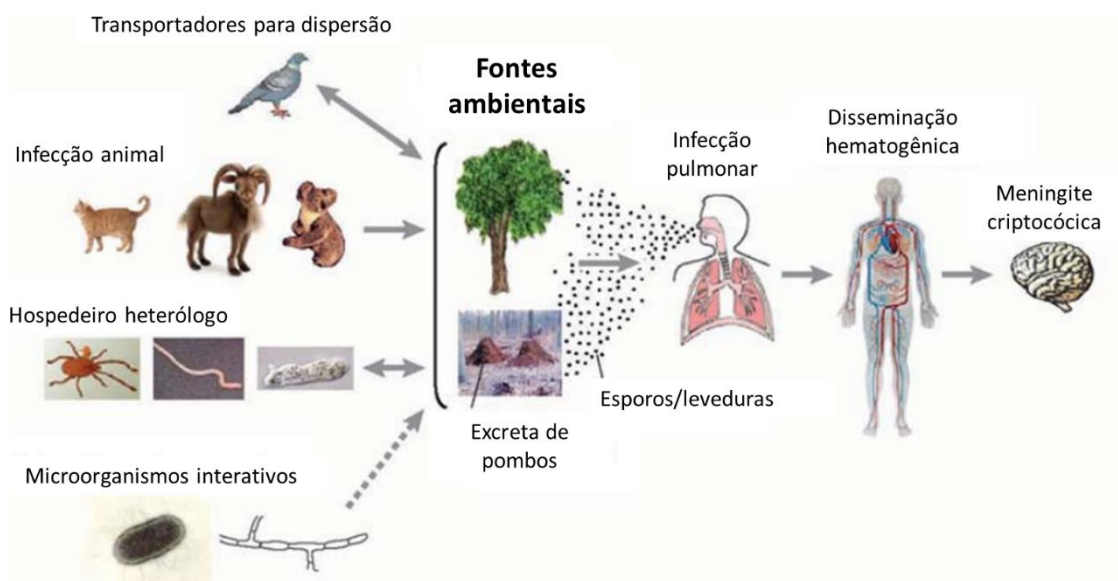


Figura 1: Ciclo de infecção de *Cryptococcus*. O fungo sobrevive em solos (frequentemente contaminados com excreta de pombos) e em árvores. Pássaros, especialmente pombos, podem ser responsáveis pela dispersão. O fungo infecta uma série de animais que atuam como hospedeiros, como gatos, cabras e coalas. Podem também sobreviver em organismos ambientais como insetos, vermes e amebas, podendo interagir também com bactérias e outros fungos. Esta levedura, estabelece uma infecção pulmonar no hospedeiro humano, por meio da inalação de esporos ou células dissecadas. O fungo pode atingir o sistema nervoso central, em imunocomprometidos, causando a mais severa forma da criptococose humana. Adaptado de LIN, HEITMAN, 2006.

Para que a infecção por *C. neoformans* seja estabelecida, é necessário que o fungo desenvolva diversos mecanismos que determinam o sucesso da infecção. Estes mecanismos estão principalmente associados com a sobrevivência e proliferação de *C. neoformans* no ambiente hostil do hospedeiro. Para tal, é necessário que ocorra a modulação do sistema imune do hospedeiro, a expressão de determinantes de virulência e o desenvolvimento de estratégias para passagem da BHE (SABIITI; MAY, 2012).

1.2. Mecanismos de sobrevivência e proliferação de *C. neoformans*

1.2.1. Estratégias de transmigração pela BHE

A infecção causada por *C. neoformans* atinge preferencialmente a região cerebral do hospedeiro, uma vez que a meningoencefalite é a manifestação clínica prevalente entre pacientes infectados por *C. neoformans*. Para colonizar o Sistema Nervoso Central (SNC) é necessário que as células fúngicas se disseminem pelo sistema circulatório, atingindo o SNC por meio da passagem pelo tecido endotelial que compõe a BHE (LIU; PERLIN; XUE, 2012).

Três mecanismos são estabelecidos como principais vias utilizadas por *C. neoformans* para transmigração da BHE (Figura 2) (ESHER; ZARAGOZA; ALSPAUGH, 2018; LIU; PERLIN; XUE, 2012; TAYLOR-SMITH; MAY, 2016). *C. neoformans* pode transmigrar de forma paracelular, na qual a passagem pela BHE se dá entre as células endoteliais, pela modificação estrutural de junções que conectam estas células (CHARLIER et al., 2005; VU et al., 2013). O segundo mecanismo é o transcelular, que se caracteriza pela internalização de *C. neoformans* pelas células endoteliais na parte apical e subsequente liberação da levedura na parte basolateral da BHE (CHEN et al., 2003). O terceiro mecanismo é denominado “Cavalo de troia”, no qual células de *C. neoformans* são capazes de atingir o tecido cerebral, atravessando a BHE dentro de macrófagos ou monócitos. Desta forma, a interação de *C. neoformans* com macrófagos e sua sobrevivência dentro do ambiente hostil das células de macrófagos são determinantes para o sucesso da infecção. Uma vez fagocitado, *C. neoformans* é capaz de modular o processo de maturação dos macrófagos, neutralizando o ambiente inóspito do fagossomos (SMITH; DIXON; MAY, 2015). Estas modificações não só permitem sua sobrevivência, como também favorecem sua proliferação nos macrófagos do hospedeiro. Além disso, as células de *C. neoformans* podem ser liberadas dos macrófagos por meio de um mecanismo não-lítico de exocitose denominado vomocitose (ESHER; ZARAGOZA; ALSPAUGH, 2018; MONTES; LEVITZ; CASADEVALL, 2016).

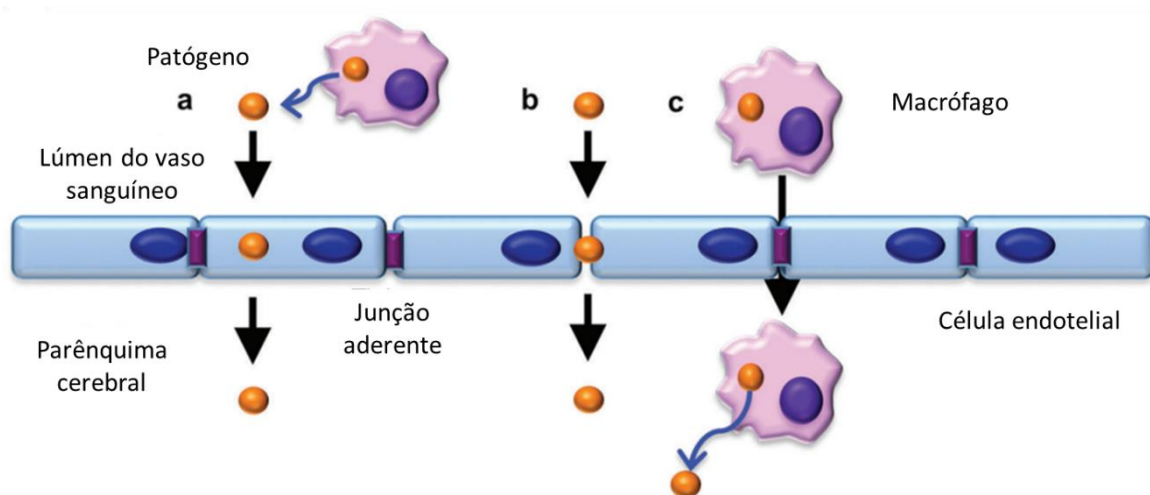


Figura 2: Mecanismos de transmigração da BHE. Patógenos podem cruzar a BHE de forma transcelular (a), na qual o patógeno é endocitado diretamente pela célula endotelial; de forma paracelular (b), causando danos nas junções aderentes, o que vai permitir a passagem da célula fúngica por entre as células endoteliais; e pelo mecanismo de “Cavalo de troia”, onde células fagocíticas infectadas com o fungo, cruzam a BHE com o patógeno internalizado para o parênquima cerebral. Adaptado de LIU, PERLIN, XUE, 2012.

A capacidade das células de *C. neoformans* de sobreviverem no macrófago, bem como o nível de macrófagos presentes no hospedeiro influenciam a severidade da infecção. Camundongos que possuem uma redução no nível de macrófagos, apresentaram uma redução nas taxas de infecção cerebral e mortalidade (KECHICHIAN; SHEA; DEL POETA, 2007). Por este motivo, o mecanismo de transmigração via “Cavalo de troia” é de extrema importância para o progresso da infecção fúngica.

1.2.2. Determinantes de virulência

A fim de propriamente sobreviver e proliferar dentro de um organismo hospedeiro, as células de *C. neoformans* necessitam desenvolver habilidades que as permitam adaptar-se às condições ambientais hostis de sobrevivência, além de burlar as defesas do hospedeiro para dar progresso à infecção. Existem inúmeros mecanismos utilizados por *C. neoformans* para estes fins, que podem promover tanto alterações metabólicas quanto estruturais na célula. Nesta seção, serão abordados os mecanismos mais clássicos e determinantes para a sobrevivência e proliferação de *C. neoformans*.

A habilidade de desenvolvimento na temperatura de 37 °C é obrigatória para qualquer organismo patógeno humano. Portanto, o crescimento das células de *C. neoformans* nesta temperatura determina a sua virulência. Dentre as mais de 70 espécies de *Cryptococcus*, apenas *C. neoformans* e *Cryptococcus gattii* possuem a capacidade de desenvolvimento à 37 °C e apenas estas duas são consideradas patogênicas para humanos (KWON-CHUNG et al., 2016). Além disso, alterações em vias de sinalização que regulam o crescimento à 37 °C podem causar alterações na virulência de *C. neoformans*. Por exemplo, foi demonstrado que a via de sinalização de Ca²⁺/calcineurina é imprescindível para o crescimento à 37 °C, uma vez que mutantes que possuem a deleção gene da calcineurina (*CNA1*) não são capazes de se desenvolver nesta temperatura, além de serem avirulentos (FOX et al., 2001; ODOM et al., 1997a).

A formação de uma cápsula polissacarídica pelas células de *C. neoformans* é essencial para o desenvolvimento deste fungo no hospedeiro. A cápsula de *C. neoformans* é ancorada em sua parede celular e é majoritariamente composta pelos polissacarídeos glucoronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM). Em menor proporção, também contêm manoproteínas, ácido hialurônico e ácido sialico (KWON-CHUNG et al.,

2016). Esta estrutura confere proteção contra fagocitose e pode modular respostas imunes do hospedeiro (OKAGAKI et al., 2010; ZARAGOZA et al., 2008). Também possui um papel importante para a sobrevivência do fungo quando internalizado por macrófagos, protegendo contra estresse oxidativo, inativando moléculas antimicrobianas, facilitando a entrada de nutrientes e diluindo o conteúdo lisossomal (GARCÍA-RODAS; ZARAGOZA, 2012). O tamanho e a antigenicidade da cápsula são variáveis e dependentes dos estímulos ambientais recebidos pelas células de *C. neoformans*, como concentração de ferro, nitrogênio, glicose e disponibilidade de CO₂ (VARTIVARIAN et al., 1993). A importância da cápsula para sobrevivência e progressão da infecção é confirmada em linhagens mutantes incapazes de produzir esta estrutura, uma vez que estas linhagens também apresentam-se avirulentas (KWON-CHUNG et al., 2016).

A produção de melanina em *C. neoformans* também é considerada uma estratégia protetiva importante contra os estresses ambientais nos quais o fungo tem de superar. A melanina é um pigmento depositado na parede celular do fungo, que confere proteção contra a fagocitose (LIU; TEWARI; WILLIAMSON, 1999), moléculas oxidantes (BLASI et al., 1995), peptídeos microbicidas (DOERING et al., 1999) e até mesmo drogas antifúngicas como anfotericina B, caspofungina (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006) e azóis (VAN DUIN et al., 2004). A célula de *C. neoformans* produz melanina a partir da transcrição dos genes *LAC1* e *LAC2*. Foi observado que mutantes de *C. neoformans* contendo a deleção do gene *LAC1*, apresentam virulência reduzida (PUKKILA-WORLEY et al., 2005; SALAS et al., 1996), demonstrando a importância desta molécula para a adaptação do fungo nas condições estressantes em que são expostos durante a infecção.

Algumas enzimas produzidas por *C. neoformans* também contribuem de forma essencial para a progressão da infecção no hospedeiro. Dentre elas estão a fosfolipase 1 (Plb1) e a urease (Ure1), enzimas que possuem uma alta relevância para os mecanismos de transmigração. Plb1 hidrolisa ligações ésteres em glicerofosfolipídeos. Por meio desta atividade, esta enzima tem a função de desestabilizar membranas, causar lise celular, favorecer a disseminação do fungo para a corrente sanguínea e alterar a composição de moléculas surfactantes pulmonares, facilitando a aderência das células de *C. neoformans* no pulmão (GHANNOUM, 2000; SANTANGELO et al., 2004; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). Plb1 possui um papel importante para a transmigração e colonização do tecido cerebral, uma vez que esta enzima contribui com o aumento da

fagocitose e sobrevivência de *C. neoformans* em macrófagos. Além disso, Plb1 também auxilia no processo de passagem da BHE (NOVERR et al., 2003; WRIGHT et al., 2007). Devido à isso, a deleção do gene *PLB1* em *C. neoformans* reduz a virulência e inibe o crescimento desta levedura em macrófagos (CHEN et al., 1997).

Da mesma forma, mutações que geram a deleção do gene *URE1* em *C. neoformans* também levam a diminuição da virulência da linhagem mutante (COX et al., 2000). Ure1 catalisa a hidrólise de ureia em amônia e carbamato. Esta atividade de hidrólise permite com que Ure1 auxilie principalmente no processo de invasão do SNC, aumentando número de sítios de transmigração na BHE (OLSZEWSKI et al., 2004).

1.3. A Parede celular de *C. neoformans*

A parede celular que compõe a célula fúngica é uma organela essencial para a sobrevivência dos fungos. Esta estrutura confere proteção contra condições ambientais adversas como calor, frio, dessecação e estresse osmótico. A parede celular também auxilia na colonização de novos ambientes, por possuir propriedades adesivas, além de participar da formação de biofilmes. A estrutura da parede celular também tem a função de ancorar a cápsula polissacarídica produzida pelo fungo. Considerando as variadas funções da parede celular para a célula fúngica, a manutenção de sua estrutura é de vital importância para a determinação da sua virulência e patogenicidade.

1.3.1. Estrutura e composição

A parede celular de *C. neoformans* é composta por glucanas, quitinas e quitosanas, mananas e/ou galactomananas, glicoproteínas e melanina (Figura 3). As glucanas são sintetizadas pela glucano sintase Fks1 (KARTSONIS; NIELSEN; DOUGLAS, 2003), que se localiza associada à membrana plasmática. As quitinas são sintetizadas por oito quitina sintases (Chs1, Chs2, Chs3, Chs4, Chs5, Chs6, Chs7, Chs8) (BANKS et al., 2005) cuja localização também está associada à membrana plasmática. Ao serem sintetizadas, ambas as quitinas e glucanas são imediatamente secretadas para o exterior da célula e organizadas de forma a iniciar a montagem da parede celular. As moléculas de quitina recém sintetizadas podem também ser desacetiladas por quitino desacetilases, gerando moléculas de quitosana. As glicoproteínas que compõe a parede celular são sintetizadas no retículo endoplasmático e são secretadas por meio de vesículas extracelulares. A perda de qualquer um destes componentes da parede celular resulta em drásticos efeitos no crescimento,

morfologia e viabilidade da célula, ressaltando a importância da parede celular para o fungo (FREE, 2013).

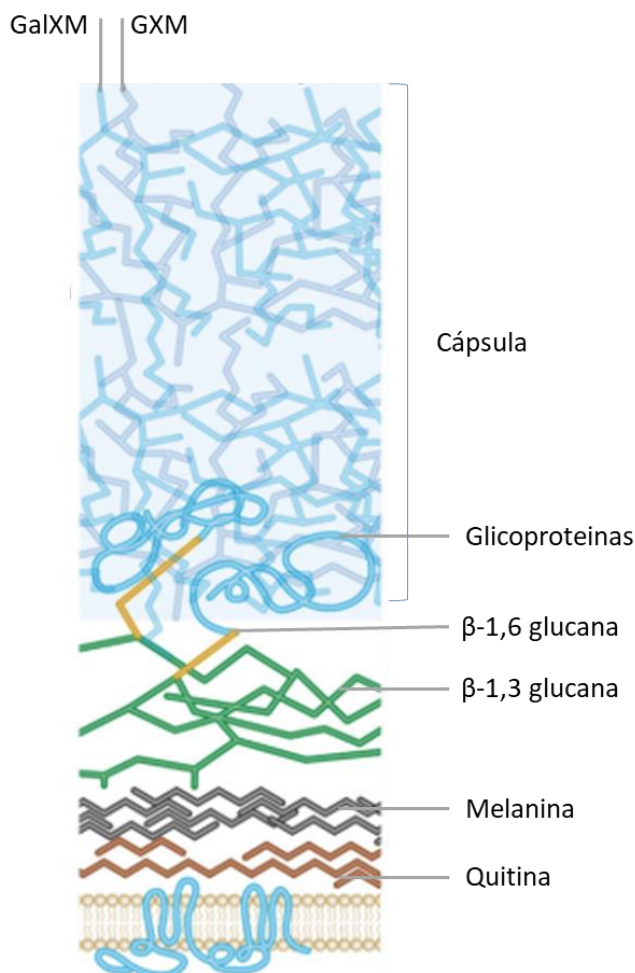


Figura 3: Organização estrutural da parede celular de *C. neoformans*. Em *C. neoformans*, a cápsula polissacarídica é composta por GXM e GalXM. A parede celular é composta majoritariamente por 1,3- β -glucanas, 1,6- β -glucanas e quitina, porém a maior parte da quitina é desacetilada em quitosana e parte do conteúdo de quitina/quitosana se localiza na membrana plasmática. A parede celular de *C. neoformans* também possui uma camada composta por melanina, cuja localização precisa ainda é desconhecida, possivelmente estando localizada próximo à camada de quitina. Adaptado de GOW, LATGE, MUNRO, 2017.

Em *C. neoformans* a parede celular é estruturada em duas camadas interna e externa. A camada interna é composta por β -glucanas, quitina, assim como manoproteínas e melanina que são mais abundantes na camada interna, apesar de estarem distribuídas por toda a parede celular. A camada externa é composta majoritariamente por α e β -glucanas (Figura 4) (AGUSTINHO et al., 2018).

Cada um dos componentes da parede celular possui um papel específico na manutenção da sua estrutura e função. Dentre as glucanas, a 1,3- β -glucana tem a função de estruturação da parede celular, ocorrendo em um polímero longo. Este polímero é

ramificado em pequenas cadeias de 1,6- β -glucanas, que auxiliam no *crosslink* entre os polímeros de glucana, assim como com quitinas e glicoproteínas (GOW; LATGE; MUNRO, 2017). As quitinas e quitosanas contribuem com a manutenção da integridade e flexibilidade da parede celular, e juntamente com os quitooligômeros, as quitinas também participam da arquitetura capsular (BANKS et al., 2005).

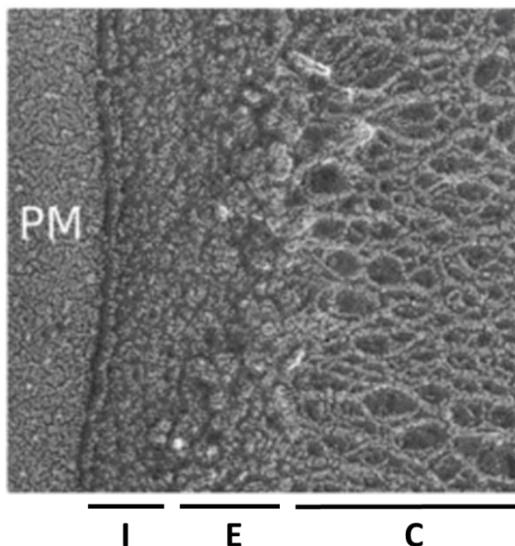


Figura 4: Camadas que compõe a parede celular. (PM), membrana plasmática; (I), camada interna; (E), camada externa; (C), cápsula polissacarídica. Adaptado de AGUSTINHO et al., 2018.

1.3.2. Reguladores da integridade da parede celular

A manutenção da Integridade da Parede Celular (IPC) em *C. neoformans* é regulada por uma complexa via de sinalização, envolvendo cascatas de fosforilação que transduzem sinais de estresses ambientais, gerando respostas celulares. Esta via é conservada entre as diferentes espécies de fungos e o seu funcionamento basal é necessário para o crescimento até mesmo em condições padrão de crescimento (Figura 5) (DICHTL; SAMANTARAY, 2016).

A via de sinalização canônica de manutenção da IPC é iniciada pela percepção de modificações no ambiente externo, por sensores de parede celular localizados na superfície da célula. Em *C. neoformans*, estas proteínas ainda não foram identificadas ou caracterizadas. Uma sequência homóloga aos genes *Mtl1/Mid2* de *Sacharomyces cerevisiae* foi identificado como putativa proteína sensora de parede celular, porém seu papel na IPC

não foi estabelecido (DICHTL; SAMANTARAY, 2016; KOCK; DUFRÊNE; HEINISCH, 2015). Portanto, ainda não está claro como a transdução de sinal inicia-se nesta levedura.

Após sensibilizar sensores de parede celular, o estímulo externo é transduzido para proteínas GEF (do inglês, *Guanine nucleotide Exchange Factors*). As GEFs induzem a reação de troca de GDP por GTP, ativando proteínas *downstream* à via da IPC, denominadas Rho GTPases. O genoma de *C. neoformans* possui três GEFs codificadas por *ROM2*, *ROM20* e *ROM21*, bem como três Rho GTPases codificadas por *RHO1*, *RHO10* e *RHO11* (FUCHS; TANG; MYLONAKIS, 2007; TANG et al., 2005). A deleção destes genes provoca alterações morfológicas na célula e fenótipos relacionados à estresse de parede celular (GERIK et al., 2005; LAM; GERIK; LODGE, 2013).

A ativação de Rho GTPases em *C. neoformans* induz a ativação da serina/treonina proteína-quinase C (Pkc1), dando início a uma cascata de transdução de sinal mediada por fosforilação. Pkc1 é não só um regulador central da manutenção da IPC, como também de processos celulares independentes IPC, por exemplo, processos de metabolismo energético, regulação do ciclo celular e mecanismos de endocitose, citocinese e autofagia (HEINISCH; RODICIO, 2018). Em *C. neoformans*, mutantes que possuem a deleção do gene *PKC1* são suscetíveis à estresses nitrosativo e osmótico, estresses de parede e de membrana. Além disso, linhagens *pkc1* Δ possuem deformações na cápsula polissacarídica e são sensíveis ao tratamento com fluconazol (GERIK et al., 2008).

Após a ativação de Pkc1, a transdução do sinal será transmitido para um módulo de proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs, do inglês *Mitogen Activated Protein kinases*), composto por Bck1, Mkk2 e Mpk1 (LAM; GERIK; LODGE, 2013; LEE et al., 2012). Este módulo, por sua vez, irá ativar os fatores transcricionais Rlm1, Swi4 e Swi6 (DICHTL; SAMANTARAY, 2016). Dentro do núcleo, estes fatores regulam a transcrição de genes responsivos aos estresses que desencadearam a transdução de sinal, por exemplo, ativando a síntese de componentes da parede celular, como quitina sintases e β -glucano sintases.

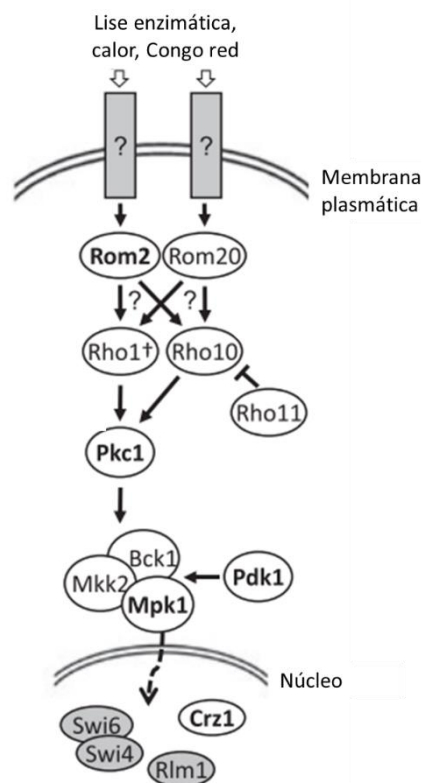


Figura 5: Representação esquemática da via de sinalização da IPC. A via de sinalização da IPC é iniciada a partir da sensibilização de proteínas ancoradas na membrana plasmática por um estresse externo. De forma desconhecida, ocorre a ativação das GEFs Rom1 e Rom20. As GEF induzem a ativação das Rho-GTPases Rho1 e Rho10, que vão atuar em seu alvo *downstream* Pkc1. Uma via de MAPKs composta por Bck1, Mkk2 e Mpk1 é ativada por Pkc1 e atua ativando fatores de transcrição, como Swi4, Swi6, Rlm1 e Crz1. Dentro do núcleo, estes fatores de transcrição atuam regulando genes envolvidos com a manutenção da IPC. Adaptado de DICHTL, SAMANTARAY, 2016.

A regulação da IPC também é dependente do *crossstalk* entre a via de manutenção da IPC com outras vias de regulação funcionais na célula, como a via de sinalização de cálcio/calcineurina. Em *C. neoformans*, foi observado que o fator de transcrição Crz1, componente da via da calcineurina, é um alvo *downstream* de Pkc1 (ADLER et al., 2011). Em um outro estudo que detalha um conjunto de genes regulados por Crz1, demonstrou

que genes envolvidos com a síntese e manutenção da parede celular fazem parte desse conjunto. Entre eles estão quitina sintases (*CHS5*, *CHS6* e *CHS7*), a quitinase *CH11*, endo e exo β -glucanases, dentre outros (CHOW et al., 2017).

1.4. Regulação da homeostase de Ca^{2+} mediada pela via da calcineurina

Íons cálcio (Ca^{2+}) são importantes mensageiros celulares em diversos organismos. Em células fúngicas, a concentração citosólica de Ca^{2+} se encontra na faixa de 50 a 200 nM, enquanto no exterior da célula, a concentração de Ca^{2+} pode variar de 1 μM a 100 mM (CUI et al., 2009a, 2009b). A geração de rápidos influxos de Ca^{2+} para o meio citosólico é um importante sinalizador de estresses ambientais, ocorrendo em resposta a estresses hiperosmóticos, alcalinos, estresses por frio ou calor, estresses oxidativos e etanoicos (KOZUBOWSKI et al., 2011; TENG et al., 2013). Além disso, o aumento nos níveis citosólicos de Ca^{2+} pode afetar diversos processos celulares, incluindo a progressão do ciclo celular, esporulação, germinação de esporos, crescimento e ramificação das hifas, expressão gênica e o ciclo circadiano (LIU et al., 2015a). Nesse contexto, vias de sinalização atuam ativamente para a manutenção da homeostase de Ca^{2+} no ambiente intracelular.

Uma das mais conservadas vias de manutenção da homeostase de Ca^{2+} é a via da calcineurina (Figura 6). Esta via regula a homeostase de Ca^{2+} em diversos fungos patógenos tanto de plantas como de mamíferos, incluindo *C. neoformans*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Magnaporthe oryzae* e *Botrytis cinerea* (FU et al., 2018; KIM et al., 2010; ONYEWU et al., 2004; SCHUMACHER; DE LARRINOVA; TUDZYNSKI, 2008; SORIANI et al., 2008). A calcineurina é uma fosfatase serina/treonina-específica Ca^{2+} /calmodulina-dependente, composta pelas subunidades catalítica (CNA) e regulatória (CNB). Sua estrutura é mantida por duas chaperonas, ciclofilina A e FKBP12 (LIU et al., 2015a).

A sinalização mediada por Ca^{2+} /calcineurina inicia-se pela entrada de íons de Ca^{2+} para o interior da célula, através de canais de Ca^{2+} como Cch1 e Mid1. O aumento da concentração de Ca^{2+} induz a ativação da proteína calmodulina (CaM), possibilitando a ligação de CaM na subunidade CNA, ativando a atividade de fosfatase da calcineurina. Uma vez ativada, a calcineurina inicia a defosforilação de seus alvos *downstream* (LIU et al., 2015a). Esta via pode ser inativada pelas moléculas ciclosporina e FK506, que inibem a

atividade das chaperonas ciclofilina A e FKBP12 respectivamente, impedindo a manutenção da estrutura e a atividade da calcineurina.

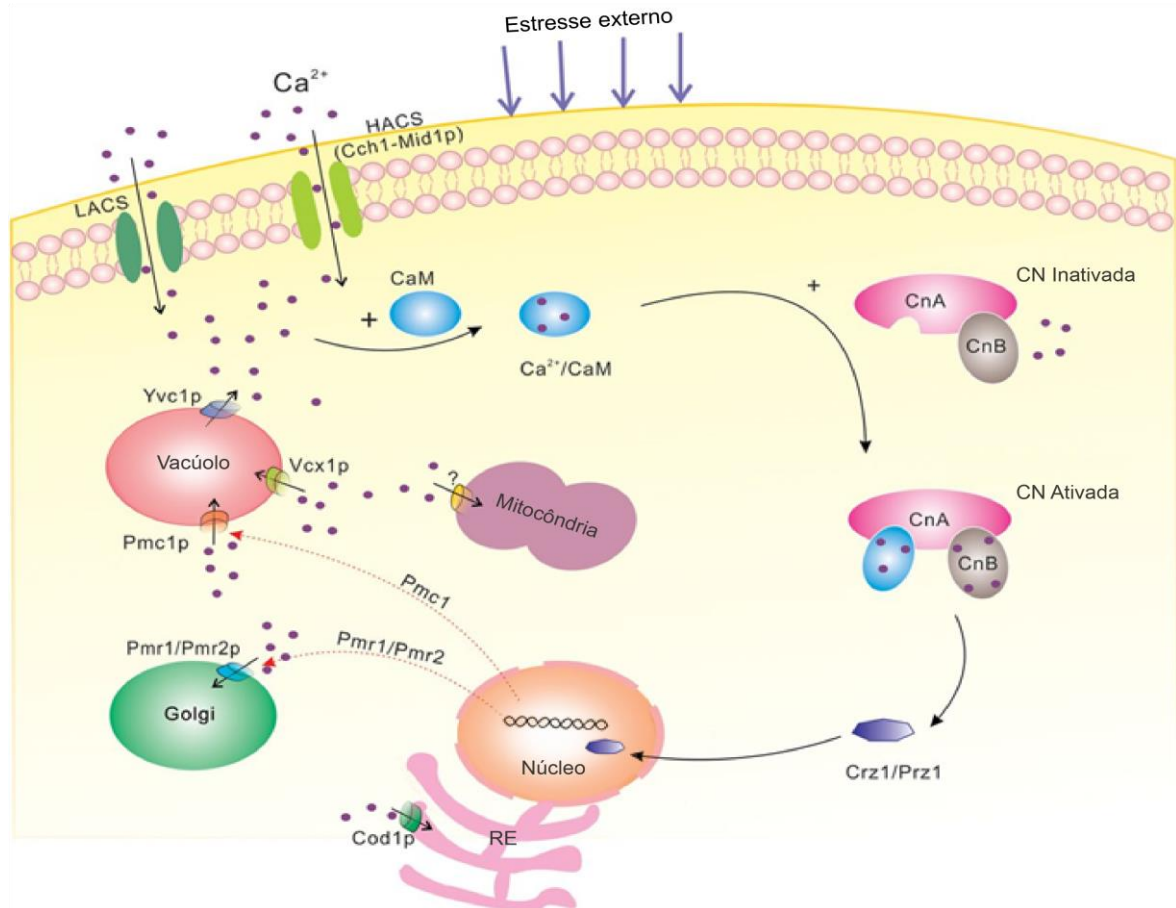


Figura 6: Representação da via de sinalização Ca^{2+} -calcineurina em células de fungos. Quando há a ocorrência de um estresse externo, sistemas de influxo de Ca^{2+} são ativados resultando em um rápido aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Este aumento na concentração de Ca^{2+} promove a ativação de CaM; a ativação de CaM permite sua ligação na subunidade A da CN, simultaneamente como ligação de Ca^{2+} na subunidade B da CN, causando a ativação de CN. CN ativada atua em alvos *downstream* CRZ1 e PRZ1, induzindo sua defosforilação e translocação para o núcleo. CRZ1 e PRZ1 regulam a expressão de uma série de genes Ca^{2+} -CN dependentes, que vão atuar regulando os níveis intracelulares de Ca^{2+} . CaM: calmodulina; CN: calcineurina; RE: retículo endoplasmático. LACS: sistema de influxo de Ca^{2+} de baixa afinidade; HACS: sistema de influxo de Ca^{2+} de alta afinidade. Adaptado de LIU et al. 2015.

Um dos principais alvos de defosforilação da calcineurina é o fator de transcrição Crz1 (do inglês, *Calcineurin Responsive Zinc finger 1*). Quando inativo, Crz1 encontra-se no citoplasma e ao ser defosforilado pela calcineurina, será translocado para o núcleo. No núcleo, Crz1 ativa a transcrição de um variado conjunto de genes como transportadores de cálcio, genes envolvidos com a síntese e manutenção da parede celular, com a variação da temperatura e com a virulência (CHOW et al., 2017). Foi observado que deleção do gene *CRZ1* torna a célula *C. neoformans* sensível ao crescimento na temperatura de 37 °C, em

altas concentrações de CaCl_2 e NaCl e em condições de estresse de parede (Figura 7) (LEV et al., 2012).

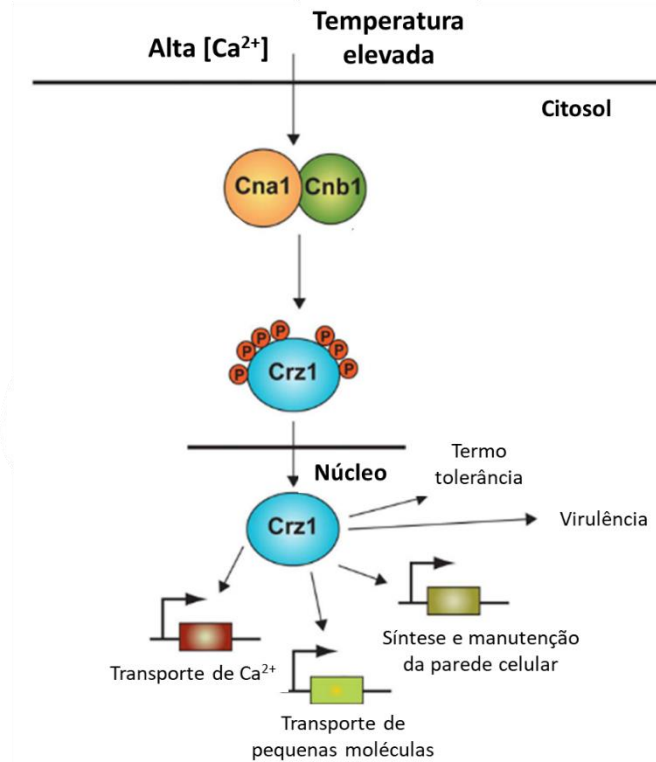


Figura 7: Representação da sinalização de calcineurina-Crz1 em *Cryptococcus neoformans*. Crz1 regula a expressão de genes responsivos à estresses, como aqueles envolvidos com a manutenção da IPC. Também regula a expressão de genes envolvidos com o transporte de pequenas moléculas e com a virulência. Adaptado de CHOW et al. 2017.

Dentre os mecanismos que auxiliam na manutenção da homeostase de Ca^{2+} , desencadeados pela via da calcineurina, o transporte de Ca^{2+} para o interior de organelas parece ser a solução mais direta para a diminuição dos níveis citosólicos de Ca^{2+} . Nesse sentido, transportadores de Ca^{2+} reticulares como Eca1 e vacuolares como Pmc1, Vcx1 e Yvc1, atuam promovendo a diminuição de Ca^{2+} citosólico pelo sequestro deste íon para dentro do retículo endoplasmático e dos vacúolos.

Para aprofundar o entendimento da importância do transportador vacuolar Ca^{2+} -ATPase Pmc1, nosso grupo de estudo iniciou a caracterização funcional do gene *PMC1* em *C. neoformans*. Por meio da construção de uma linhagem mutante *pmc1Δ*, foi possível observar que a deleção de *PMC1* causa a sensibilidade do mutante em crescimento sob altas concentrações de Ca^{2+} , além do acúmulo de grandes quantidades Ca^{2+} no citosol da

célula mutante (KMETZSCH et al., 2013). A partir da infecção de camundongos, também foi possível verificar que o mutante *pmc1Δ* apresenta capacidade de virulência e disseminação reduzidas em comparação à linhagem selvagem. Grupos de camundongos infectados com o mutante *pmc1Δ* apresentaram uma drástica redução na taxa de mortalidade, diminuição da carga fúngica nos pulmões e ausência de carga fúngica no tecido cerebral, em relação aos grupos infectados com a linhagem selvagem (KMETZSCH et al., 2013; SQUIZANI et al., 2018).

Devido à notável importância de *Pmc1* para a virulência e proliferação de *C. neoformans*, foi realizada a análise do perfil transcricional da linhagem *pmc1Δ* em comparação com a linhagem de *C. neoformans* selvagem, por RNA-seq. A partir desta análise foi possível observar que genes determinantes de virulência, envolvidos com a transmigração, como *PLB1*, *URE1* e o transportador de níquel *NIC1* apresentaram níveis de expressão reduzidos na linhagem mutante. Além disso, também foi observado alterações na expressão de genes envolvidos com a via da calcineurina, como o aumento da expressão do fator de transcrição *CRZ1* e a diminuição da expressão da proteína calmodulina, codificada por *CAM1* (SQUIZANI et al., 2018).

Visando identificar novos componentes (alvos ou reguladores) da via de sinalização da calcineurina, utilizamos os dados produzidos por esta análise de RNA-seq para identificar um novo alvo de estudo potencialmente envolvido com esta via. Para isso, foram selecionados genes que apresentaram alterações na expressão devido à ausência do gene *PMCI*, e com potencial função regulatória de genes, pela presença de um domínio predito *zinc finger* (MARQUES et al, dados não publicados). Desta forma, selecionamos a proteína hipotética CNAG_03913, nomeada a partir de seu domínio predito de And1 (do inglês, *ANI-like zinc finger containing domain*).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Caracterizar funcionalmente o gene *AND1* como potencial componente da via de sinalização de Ca^{2+} em *C. neoformans*

2.2. Objetivos específicos

- I) Construir linhagens mutante e complementada para o gene *AND1* em *C. neoformans*;
- II) Identificar fenótipos associados à deleção do gene *AND1*;
- III) Avaliar a capacidade da linhagem mutante em expressar determinantes de virulência;
- IV) Avaliar a expressão diferencial de genes relacionados à via de sinalização mediada por calcineurina e/ou relacionados com integridade da parede celular na linhagem mutante em relação à linhagem selvagem em *C. neoformans*.

3. Resultados

Os resultados deste trabalho encontram-se na forma de um manuscrito, intitulado *Functional characterization of And1 as a potential component of the calcium signaling pathway in Cryptococcus neoformans*, e redigido de acordo com as normas do periódico *Molecular Microbiology*. Os autores do manuscrito estão abaixo listados, assim como as suas contribuições para o desenvolvimento do trabalho.

Bárbara Machado Marques, Julia Sperotto, Julia Catarina Vieira Reuwsaat, Eamim Daidre Squizani, Ane Wichine Acosta Garcia, Heryk Motta, Natália Kronbauer Oliveira, Marilene Henning Vainstein, Charley Christian Staats, Livia Kmetzsch.

Functional characterization of And1 as a potential component of the calcium signaling pathway in Cryptococcus neoformans

Contribuição dos autores:

BMM: delineamento experimental, aquisição de dados, análise e interpretação de dados, redação do manuscrito; JS, JCVR, BMM, EDS, AWAC, HM e NKO: auxílio na aquisição de dados, análise e interpretação dos dados; CCS: delineamento experimental, análise e interpretação dos dados, suporte financeiro, revisão crítica do manuscrito; MHV: delineamento experimental, suporte financeiro, revisão crítica do manuscrito; LK: delineamento experimental, análise e interpretação dos dados, suporte financeiro, revisão crítica do manuscrito.

Functional characterization of And1 as a potential component of the calcium signaling pathway in *Cryptococcus neoformans*

Running title: Characterization of And1 as a calcium signaling component

Bárbara Machado Marques ^a, Julia Sperotto ^a, Julia Catarina Vieira Reuwsaat ^a, Eamim Daidre Squizani ^a, Ane Wichine Acosta Garcia ^a, Heryk Motta ^a, Natália Kronbauer Oliveira ^a, Marilene Henning Vainstein ^a, Charley Christian Staats ^a, Livia Kmetzsch ^{a,b} *.

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^b Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil* Corresponding author. Address: Av Bento Gonçalves, 9500, Bloco IV, prédio 43421, sala 220. Porto Alegre, RS, Brazil. CEP: 91.501-970. Telephone number: +55 51 3308 7767.

E-mail address: liviak@cbiot.ufrgs.br (L. Kmetzsch)

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, calcineurin, calcium, cell wall, virulence, cryptococcosis

Summary

Cryptococcus neoformans is an opportunistic pathogen that is able to disseminate from the lungs to the central nervous system (CNS), resulting in often fatal cryptococcal meningoencephalitis. Calcium (Ca²⁺) is a cellular messenger that regulates the calcineurin signaling, a pathway responsible for several cryptococcal traits, including virulence. Vacuolar Ca²⁺ transporters, such as Pmc1, coordinate the regulation of Ca²⁺ intracellular levels. We have previously shown that Pmc1 is required for proper virulence of *C. neoformans*, as mice infected with cryptococcal mutant strains lacking the *PMCI* gene (*pmc1Δ*) were less infected. In addition, we found that Pmc1 indirectly regulates hundreds of genes. Aiming to identify possible calcineurin regulators or targets, we selected genes whose expression is modulated by the absence of *PMCI*. We focused on proteins

containing signatures of DNA binding-proteins and selected the *CNAG_03913* gene. RT-qPCR analysis revealed that this gene is highly expressed on *pmc1Δ* in the presence of FK506, suggesting a participation in the Ca^{2+} /calcineurin signaling pathway. Bioinformatics analysis revealed the presence of AN1-like zinc finger domain, which lead us to name such gene as *AND1* (AN1-like zinc finger containing domain). To functionally characterize the role of *AND1*, a null mutant strain (*and1Δ*) and a complemented strain (*and1Δ::AND1*) have been constructed. We performed phenotypic assays using Congo red to evaluate potential defects in cell wall, a trait whose proper function is dependent on the activity of Ca^{2+} /calcineurin signaling pathway. Cells lacking *AND1* were hypersensitive to Congo red only in YPD 0.5X, suggesting also a crosstalk with osmolarity maintenance pathways. Differences were also observed in the expression of *CHS3*, *CHS5* and *CHS8* chitin synthases genes, *CHI22* chitinase and *PKC1* genes, suggesting a possible cell wall-related defect in the *and1Δ* knockout strain.

Introduction

Cryptococcus neoformans is a worldwide-distributed pathogen and is the main agent of fungal meningoencephalitis in immunocompromised individuals (Thinyane *et al.*, 2015). The cases of cryptococcal meningitis have an estimated annual incidence of 223,000 cases, leading to 181,000 deaths each year (Rajasingham *et al.*, 2017). The infection is established by the inhalation of environmental basidiospores or desiccated yeasts, with further colonization of the lungs. As the infection advances, the yeast cells are able to reach the vascular system, overcome the blood-brain barrier (BBB) and transmigrate to the brain, where it will cause meningoencephalitis (Sabiiti and May, 2012).

The progress of the cryptococcal infection is driven by a range of virulence determinants, which will allow *C. neoformans* cells to survive into the host harsh environment. The polysaccharide capsule development, melanin production, and thermo-tolerance are considered the classical virulence factors. Likewise, the production of enzymes such as phospholipase B1 and urease, and release of extracellular vesicles are also required mechanisms for virulence (Alspaugh, 2015; Maziarz *et al.*, 2018).

To properly produce virulence determinants and consequently survive inside the host, cryptococcal cells are dependent of the calcium (Ca^{2+}) signal transduction, which is mediated by the calcineurin signaling pathway. This pathway regulates adaptive responses to several toxic conditions, as heat, cell wall- and membrane-stresses, as well as high cation concentration (Odom *et al.*, 1997a; Odom *et al.*, 1997b; Chow *et al.*, 2017). Calcineurin is a serine/threonine-specific protein phosphatase, activated by calmodulin when the intracellular levels of Ca^{2+} are high. In order to reestablish the normal Ca^{2+} concentration, the calcineurin leads to a set of signaling responses, activating, for example, the expression of calcium transporters (Pmc1, Vcx1, Pmr1) and transcription factors, as Crz1 (Liu *et al.*, 2015; Chow *et al.*, 2017). Due to the importance of the calcineurin pathway, antifungal drugs that can target this signaling pathway have arisen as potential antifungal drugs. Among the well-characterized calcineurin inhibitors are the ciclosporin and tacrolimus (FK506) (Fox *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2015b).

Among the calcium transporters required for proper functioning of Ca^{2+} /calcineurin pathway, the vacuolar Ca^{2+} -ATPase Pmc1 plays a pivotal function. Cryptococcal cells lacking the *PMCI* gene were not capable to properly grow under high concentrations of

Ca²⁺, and accumulates greater amounts of Ca²⁺ in the cytosol compared to WT cells (Kmetzsch *et al.*, 2013). Furthermore, the lack of *PMCI* gene affects the yeast virulence and dissemination capacity. Mice infected with *pmc1Δ* exhibit diminished mortality rates, a lower fungal burden in the lungs and no signs of neurological infection (Kmetzsch *et al.*, 2013; Squizani *et al.*, 2018). RNA-seq analysis revealed that absence of *PMCI* led to decreased expression of several virulence determinants and genes associated with the Ca²⁺ signaling (Squizani *et al.*, 2018).

Considering the fundamental role of the calcineurin signaling in *C. neoformans*, and the importance of Pmc1 as a responsive component of this pathway, we intend to identify new potential targets or regulators involved in the calcineurin signaling pathway. We evaluated genes regulated by the absence of *PMCI* and with potential gene expression regulatory role, due to the presence of a zinc finger domain. Based on this, the hypothetical protein CNAG_03913 was selected for further functional characterization. Bioinformatics analysis revealed the presence of AN1-like zinc finger domain, which lead us to name such gene as *AND1* (AN1-like zinc finger containing domain). For functional analysis, we have constructed a mutant and complemented strain for *AND1* gene. We observed that the lack of this gene might influence the yeast tolerance to cell wall stressors and alterations in the expression of cell wall-related genes.

Results

AND1 is potentially associated with the regulation of the calcineurin signaling pathway

The *AND1* (CNAG_03913) gene has 1,476 bp length genomic sequence, which encodes two independent transcripts: *AND1_T1* (*T1*) that contains five exons and codifies a 322 amino-acid protein; *AND1_T2* (*T2*) that is composed by four exons and translates a 294 amino-acid protein. Both *T1* and *T2* codifies protein products with unknown function (hypothetical proteins), which contain a predicted domain of AN-1 like Zinc Finger domain (PF01428). In order to obtain a clue about the possible cellular function of these two proteins, we conducted *in silico* sequence analysis to search for potential Nuclear Localization Signals (NLS), using the cNLS Mapper (Kosugi *et al.*, 2009) and potential Nucleolar Localization Signals (NoLS), with the NoD tool (Scott *et al.*, 2011). We have identified an NLS peptide in both T1 and T2 transcripts, localized between the 109 and 119 residues. A NoLS site was only recognized at the T1 protein sequence between the 303 to

321 amino acids. Interestingly, the T1 NoLS peptide is located in the exon 5, the only one not shared between the two transcripts (Fig. 1).

The previous RNA-seq data obtained from our group, comparing the expression profile between WT and *pmc1Δ*, showed that the *AND1* transcripts are overexpressed in the mutant strain (Squizani *et al.*, 2018). To access the expression profile of *T1* and *T2* in conditions of calcineurin pathway inhibition with FK506, gene expression analysis was carried out by RT-qPCR. The two transcripts are overexpressed on *pmc1Δ* mutant strain compared to WT (Fig. 2). It is important to note that the expression of *T2* is significantly higher in the presence of FK506 (Fig. 2B), whereas the expression of *T1* does not change in this condition (Fig. 2A). These results suggest a potential involvement of the *AND1* transcripts with the calcineurin signaling pathway.

Absence of AND1 leads to defects in cell wall under hypo-osmotic condition

To functionally characterize the role of *AND1* in *C. neoformans* calcium homeostasis, a null mutant strain (*and1Δ*) was constructed. Phenotypic characterization assays were carried out in order to access possible defects associated with the lack of the *AND1* gene in the mutant strains. Sensitivity assays were conducted to evaluate the ability of the *and1Δ* mutant to grow under osmotic stress (Fig. 3), membrane stress (Fig. 4), oxidative stress (Fig. 5), high concentrations of Ca²⁺ (Fig. 6A) and inactivation of the calcineurin pathway (Fig. 6B). We could not find any differences between growth rates of WT and *and1Δ* strains in such conditions. The sensitivity to cell wall stressors was also accessed. While no differences of growth rate could be observed for WT and *and1Δ* strains in the presence of calcofluor white or Congo red in complete YPD medium (Fig. 7A), a hypersensitive phenotype to Congo red was observed for cells lacking *AND1* in hypo-osmotic conditions - YPD 0.5 X (Fig. 7B).

Cell wall defects observed in and1Δ strain do not trigger capsular alterations

As the assembly of cryptococcal capsule is dependent of a proper cell wall (AGUSTINHO *et al.*, 2018; FONSECA *et al.*, 2009), we evaluated if the absence of *AND1* would led to an altered capsular deposition. However, we could not detect any differences in capsule size in mutant cells lacking *AND1* compared to WT strain (Fig. 8).

Disruption of AND1 causes alterations in the expression of cell wall-related genes

Due to the *and1Δ* cells hypersensitivity to Congo red under hypo-osmotic conditions, we further evaluated which cell wall-related genes could be associated to this phenotype. The Congo red molecule is considered as a cell wall stressor due to its high affinity by chitin (Roncero and Duran, 1985). Therefore, we accessed the expression profile of a set of genes involved with the Cell Wall Integrity (CWI) maintenance, which included six chitin synthases (*CHS2*, *CHS3*, *CHS4*, *CHS5*, *CHS6* and *CHS8*), four endochitinases (*CHI2*, *CHI21*, *CHI22* and *CHI4*) and three CWI regulatory genes (*FKS1*, *PKC1* and *RLM1*). The experiments were conducted in the presence or absence of FK506, in order to evaluate a crosstalk between And1 and other proteins of the Ca²⁺-calcineurin pathway. We observed a significant decrease of *CHS3*, *CHS5* and *CHS8* transcript levels in *and1Δ* compared to WT in the absence of FK506 (Fig. 9). However, no differences in the transcriptional profiling of chitin synthase genes could be detected in WT and mutant cells cultured in the presence of FK506 (Fig. 9). For chitinase genes, a complex pattern of regulation could be found. Inhibition of Ca²⁺-calcineurin pathway and absence of *AND1* led to a pronounced effect on the expression of *CHI2* (downregulation) and *CHI21* (upregulation). *CHI22* expression regulation is dependent on *AND1* only in Ca²⁺-calcineurin proficient cells (Fig. 10). Among the CWI regulatory genes, *PKC1* displayed a lower expression in *and1Δ* comparing with WT (Fig. 11). Together, these changes on the expression of important CWI genes suggest that *AND1* might be involved in pathways that regulate the cell wall maintenance.

AND1 is not necessary for virulence in ex vivo models of cryptococcosis

In order to evaluate the association of *AND1* with cryptococcal virulence, we performed infection assays employing the murine macrophage-like cell line J774.A1. Phagocytosis index were determined employing CFU analysis after incubation for 2 h with INF- γ and LPS primed macrophage-like cells. We could not observe any difference between cells lacking *AND1* and WT cells (Fig. 12A). In addition, we determined the intracellular proliferation rate, a phenotype highly predictive of virulence in murine models of cryptococcosis. We could not also detect defects in cryptococcal proliferation inside macrophages in the absence of *AND1* (Fig. 12B).

Discussion

The cell wall is a fundamental structure for fungal cells, important for providing protection against the environmental conditions, and responsible for cell morphology (Gerik *et al.*, 2015). In this work, we demonstrated that *C. neoformans* And1 may be involved in the CWI regulation pathway. And1 harbors the *ANI-like zinc finger* domain, which is also found in another two hypothetical cryptococcal proteins (CNAG_02990 and CNAG_04829). The function of proteins that encompasses this domain is poorly understood in fungal cells. However, in *S. cerevisiae* the *ANI-like zinc finger* is found in Cuz1p and Tmc1p, both yeast proteins are components of the ubiquitination pathway and proteasome. Cells lacking *CUZ1* or *TMCI* are hypersensitive to metalotoxic stress driven by arsenite or antimonium (Hanna *et al.*, 2013; Sá-Moura *et al.*, 2013). Cryptococcal And1 is not an ortholog of yeast Cuz1p and Tmc1p. Therefore, the association of And1 with proteasome and ubiquitination needs to be accessed.

We have observed that the *and1Δ* mutant strain displays a reduced growth in the presence of cell wall stressor Congo red under hypo-osmotic shock. The expression profile of the 1,3-β-glucan synthesis component *FKS1* was not altered in the *and1Δ* mutant strain, probably indicating that the observed phenotype might be associated with the chitin content of *and1Δ* mutant cell wall. There are eight chitin synthases coded by the *C. neoformans* genome. They have different expression levels on the cryptococcal cells, with the *CHS3* possessing the most abundant transcript among all genes, followed by *CHS2*, *CHS5* and *CHS8*. The greater amount of vegetative chitin is produced by Chs4 and Chs5. Besides, the majority of chitin synthesized by Chs3 is deacetylated and converted to chitosan during *C. neoformans* vegetative growth. It has been shown that the lack of *CHS3* gene led to most severe phenotypic alterations. Moreover, *chs3Δ* mutants demonstrated defective extracellular vesicle formation and a dramatically reduced polysaccharide capsule. For this reason, Chs3 is considered the most important chitin synthase in *C. neoformans* (Banks *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2018). Considering the importance of Chs3, Chs5, and Chs8 on the chitin synthesis, the decrease in the relative expression levels on the *and1Δ* mutant represents a remarkable finding.

Chitinases are enzymes that catalyze the hydrolysis of the polymer of chitin into chitin oligomers. By participating on the cell wall remodeling, chitinases are able to regulate a variety of cellular processes in fungi, including cell separation, sexual development and hyphal growth and development (Adams, 2004; Duo-Chuan *et al.*, 2006; Baker *et al.*, 2009). The *C. neoformans* genome codifies four endochitinases: *CHI2*, *CHI21*, *CHI22*, and *CHI4*. Their roles in the sexual growth and development were previously characterized (Baker *et al.*, 2009), with *Chi22* the responsible for the main chitinase present outside the cell. An increased *CHI22* relative expression might indicate that more chitin is converted into chitin oligomers in the *and1Δ* mutant, reducing the chitin levels and weakening the cell wall. Together with the reduced availability of chitin, that might be a consequence of the low expression levels of *CHS3*, *CHS5*, and *CHS8*, it is feasible to assume that the lack of *AND1* may cause cell wall defects.

The signaling activity driven by Pkc1 is one of the most well-characterized pathways involved in cell wall integrity maintenance. It has been demonstrated that the Pkc1 pathway is activated upon hypo-osmotic shock in *S. cerevisiae* (Davenport *et al.*, 1995). This pathway is also required for the expression of chitin synthases in *Candida albicans* (*CaCHS2* and *CaCHS8*) and *S. cerevisiae* (*ScCHS3*) (Valdivia and Schekman, 2003; Lenardon *et al.*, 2010). The role of Pkc1 is conserved in *C. neoformans*. Furthermore, *CnPKC1* is required for virulence and the regulation of melanin synthesis (Heinisch and Rodicio, 2018). Therefore, the reduced expression levels of *PKC1* in the *and1Δ* strain might be an indication that *And1* is potentially involved with the regulation of the CWI.

The relationship between the *C. neoformans* CWI and the calcineurin pathway has been already described. The Pkc1-driven activation of the transcription factor *Crz1* promotes its participation in the CWI maintenance (Adler *et al.*, 2011). Furthermore, it has been demonstrated in *Candida glabrata* that the calcineurin pathway may be responsible for the control of the chitin/ β -glucan balance in the cell wall, by negatively regulating the chitin levels. In conditions that the calcineurin is inactivated by FK506, the yeast produces a chitin-rich cell wall, causing defects in cell division and cell death (Tanaka *et al.*, 2016). These observations are contrasting with the expression analysis data carried out in the present study. We observed that the inhibition of the calcineurin by FK506 reduced the expression levels of the majority of the chitin synthases evaluated. Moreover, the calcineurin inhibition also increased the expression levels of *CHI21* and *CHI4* chitinases.

In fact, these findings demonstrate that the inhibition caused by FK506 might be negatively influencing the chitin availability. Furthermore, cells lacking *CRZI* displayed severe growth impairment under cell wall stress (Lev *et al.*, 2012). In line with this observation, Crz1 regulates the expression of chitin synthases-, chitinases-, and glucanases-coding genes (Chow *et al.*, 2017). In this way, it is feasible to assume that under specific conditions, CWI and Ca²⁺/calcineurin may act in distinct directions to cope with cell wall stresses. We suggest that And1 may also be involved in the crosstalk between the CWI and the Ca²⁺/calcineurin pathways based on two findings: (i) the overexpression of *AND1* under FK506 treatment, and (ii) the sensitivity to Congo red under hypo-osmotic condition.

In this study, we demonstrated that *AND1* is involved with the calcineurin pathway in some level. It also has been shown that this gene might regulate the expression of a range of important CWI related genes. It is still unclear how *AND1* participates in the regulation of these cellular processes.

Experimental Procedures

Fungal strains, plasmids, and media

The *Cryptococcus neoformans* H99 (WT) strain was used on this study for the construction of a null mutant strain lacking the *AND1* gene. For the disruption and the reconstitution of the *AND1* gene in the WT strain, the plasmids pDNORNAT (Schneider *et al.*, 2012) and pJAF15 were respectively utilized. The yeast cells were cultivated on YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose and 1.5% agar). YPD agar plates supplemented with nourseothricin (100 µg·mL⁻¹) were used for the selection of the *and1*Δ transformants. YPD agar plates with the addition of hygromycin (200 µg·mL⁻¹) were used for the selection of *and1::AND1* complemented transformants. The plates were incubated for 48 h at 30 °C and then stored at 4 °C.

In silico analysis of C. neoformans AND1

The *AND1_T1* and *AND1_T2* sequences were recovered from the FungiDB database (available in http://fungidb.org/fungidb/app/record/gene/CNAG_03913). The search for conserved domains on the T1 and T2 protein sequences was carried out in the Pfam

platform (available in <https://pfam.xfam.org/>). Both amino acid sequences were aligned by the BioEdit Sequence Alignment Editor software and visualized on GeneDoc software. The nuclear localization and nucleolar localization signals were predicted by the cNLS Mapper (Kosugi *et al.*, 2009, available in http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi) and NoD platforms (Scott *et al.*, 2011, available in <http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-nod/>), respectively.

Disruption and complementation of Cryptococcus neoformans

The disruption of *AND1* was carried out according to DelsGate method (García-Pedrajas *et al.*, 2008). A fragment of approximately 1,000 bp was PCR amplified and purified from agarose gels (PureLink quick gel extraction kit; Invitrogen, Germany), from each 5' and 3' flanks of the gene. Both fragments were inserted into pDONRNAT plasmid by a BP clonase reaction, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA). The product from BP clonase reaction was transformed into *E. coli* TG-2. After the confirmation of the correct insertion of the fragments into the plasmid, enzymatic digestion of a plasmid amount was performed with enzyme I-SceI. The clivated plasmid was used to the biolistic transformation of *C. neoformans* H99 cells. The transformants were later screened by colony PCR and the deletion was confirmed by semi-quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR) analysis.

Prior to the complementation, a 3,400 bp fragment containing the *AND1* coding sequence as well as 1,000 bp of both 5' and 3' flanks were PCR amplified and purified from agarose gels (PureLink quick gel extraction kit; Invitrogen, Germany). The plasmid pJAF15 was propagated in *E. coli* OmniMAX and digested by EcoRV restriction enzyme. Both DNA molecules were used for biolistic transformation of the *C. neoformans and1Δ* cells. The transformants were later screened by colony PCR and the complementation was confirmed by RT-PCR analysis and by the phenotypic analysis of the positive colonies.

Phenotypic characterization analysis

For phenotypic characterization, WT and *and1Δ* were grown in YPD medium for 16 h, washed with PBS and adjusted to a cell density of 10^7 cells·mL⁻¹ in YPD. The cell suspensions were serially diluted 10-fold, and 3 μL of each dilution was spotted onto YPD 1x or YPD 0.5x (0,5% yeast extract, 1% peptone, 1% dextrose and 1.5% agar). Media were

supplemented with NaCl (1.5 M), KCl (1 and 1.5 M), SDS (0.005, 0.01, 0.02%), H₂O₂ (5 mM), CaCl₂ (100, 200 and 400 mM), FK506 (0.5 and 1 µg·mL⁻¹), Congo Red (2.5 or 5 mg·mL⁻¹) or Calcofluor White (CFW) (0.3 mg·mL⁻¹). The plates were incubated for 2 days at 30 °C and 37 °C and photographed. Capsule formation was evaluated in cells that were cultivated for 48 h in DMEM at 37 °C in 5% CO₂ or for 48 h at 30 °C in a minimal medium composed of dextrose (15 mM), MgSO₄ (10 mM), KH₂PO₄ (29.4 mM), glycine (13 mM) and thiamine-HCl (3 µM) (pH 5.5).

Quantitative Real-time PCR analysis

For the relative gene expression analysis, cells of WT and *and1Δ* were incubated at 30 °C overnight. The cells were then washed with PBS, adjusted for a concentration of 5·10⁷ cells·mL⁻¹ and incubated in RPMI media supplemented or not with FK506 and incubated at 37 °C for 1 h. Three RNA samples were independently prepared using TRIzol reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. The RNA samples were treated with DNase and the total RNA (300 ng) were used for reverse transcriptase reactions with ImProm-II Reverse transcriptase (Promega). The RT-qPCR reactions were performed on a 7500 Fast-Real Time System (Applied Biosystems). PCR thermal cycling conditions included PCR thermal cycling conditions as follows: an initial step at 94 °C for 5 min, followed by 40 cycles at 94 °C for 15 s, 60 °C for 20 s, and 72 °C for 20 s. Each qPCR reaction was prepared with Platinum SYBR green qPCR Supermix (Invitrogen) supplemented with 5 pmol of each primer and 15 ng of the cDNA template in a final volume of 20 µL. The cDNA samples were analyzed in triplicate for each primer pair. At the end of the reaction, melting curve analysis was carried out to confirm a single PCR product. Data were normalized to actin cDNA levels. Relative expression was determined by the 2^{-ΔCT} method (Livak and Schmittgen, 2001).

Macrophage assays

Macrophage-like J774.A1 cells were seeded at a density of 10⁵ cells·ml⁻¹ of DMEM supplemented with 10% FBS in each well of the 96-well culture plates. After 24 h of incubation (37 °C and 5% CO₂), the medium was replaced with fresh medium containing 10⁶ cells of each fungal strain, obtained after a 24 h incubation in YPD and extensive washing in PBS. The plates were further incubated for 2 or 24 h (37 °C, and 5% CO₂), for

PI (phagocytosis index) and IPR (intracellular proliferation rate) measurements, respectively. After the incubation time was completed, the yeast cells that were not associated with the macrophages were removed by PBS washes. Fungal survival was evaluated after macrophage lysis with 0.1% Triton X-100 and subsequent plating on YPD for CFU determination. This assay was performed in triplicate for each strain. A Student's t-test was used to determine the statistical significance of the observed differences in fungal survival. Mean values were compared with wild-type (WT) using one-way analysis of variance with Tukey's post hoc test.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq—Grant 476926/20130), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES—Grant 23038.010041/2013-13), and Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS—Grant 16/2551-0000215-0). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- Adams, D.J. (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* **150**: 2029–2035
- Adler, A., Park, Y.-D., Larsen, P., Nagarajan, V., Wollenberg, K., Qiu, J., *et al.* (2011) A Novel Specificity Protein 1 (SP1)-like Gene Regulating Protein Kinase C-1 (Pkc1)-dependent Cell Wall Integrity and Virulence Factors in *Cryptococcus neoformans* * □ S.
- Agustinho, D.P., Miller, L.C., Li, L.X., and Doering, T.L. (2018) Peeling the onion: the outer layers of *Cryptococcus neoformans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro* **113**: 1–8
- Alspaugh, J.A. (2015) Virulence Mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis; HHS Public Access. *Fungal Genet Biol* **78**: 55–58
- Baker, L.G., Specht, C.A., and Lodge, J.K. (2009) Chitinases Are Essential for Sexual Development but Not Vegetative Growth in *Cryptococcus neoformans* †. *Eukaryot Cell* **8**: 1692–1705
- Banks, I.R., Specht, C.A., Donlin, M.J., Gerik, K.J., Levitz, S.M., Lodge, J.K., and Doisy, E.A. (2005) A Chitin Synthase and Its Regulator Protein Are Critical for Chitosan Production and Growth of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans* †. *Eukaryot Cell* **4**: 1902–1912
- Blasi, E., Barluzzi, R., Mazzolla, R., Tancini, B., Saleppico, S., Puliti, M., *et al.* (1995) Role of nitric oxide and melanogenesis in the accomplishment of anticryptococcal activity

by the BV-2 microglial cell line. *J Neuroimmunol* **58**: 111–6

Boisvert, F.M., Koningsbruggen, S. Van, Navascués, J., and Lamond, A.I. (2007) The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 574–585.

Charlier, C., Chrétien, F., Baudrimont, M., Mordelet, E., Lortholary, O., and Dromer, F. (2005) Capsule Structure Changes Associated with *Cryptococcus neoformans* Crossing of the Blood-Brain Barrier. *Am J Pathol* **166**: 421–432

Chen, S.C., Muller, M., Zhou, J.Z., Wright, L.C., and Sorrell, T.C. (1997) Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? *J Infect Dis* **175**: 414–20

Chen, S.H.M., Stins, M.F., Huang, S.-H., Chen, Y.H., Kwon-Chung, K.J., Chang, Y., *et al.* (2003) *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol* **52**: 961–970

Chow, E.W.L., Clancey, S.A., Billmyre, R.B., Averette, A.F., Granek, A., Mieczkowski, P., *et al.* (2017) Elucidation of the calcineurin-Crz1 stress response transcriptional network in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. 1–29.

Cox, G.M., Mukherjee, J., Cole, G.T., Casadevall, A., and Perfect, J.R. (2000) Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun* **68**: 443–8

Cui, J., Kaandorp, J.A., Ositelu, O.O., Beaudry, V., Knight, A., Nanfack, Y.F., and Cunningham, K.W. (2009a) Simulating calcium influx and free calcium concentrations in yeast. *Cell Calcium* **45**: 123–132

Cui, J., Kaandorp, J.A., Sloom, P.M.A., Lloyd, C.M., and Filatov, M. V. (2009b) Calcium homeostasis and signaling in yeast cells and cardiac myocytes. *FEMS Yeast Res* **9**: 1137–1147

Davenport, K.R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D.E., and Gustin, M.C. (1995) A Second Osmosensing Signal Transduction Pathway in Yeast HYPOTONIC SHOCK ACTIVATES THE PKC1 PROTEIN KINASE-REGULATED CELL INTEGRITY PATHWAY*.

Dichtl, K., and Samantaray, S. (2016) Review Cell wall integrity signalling in human pathogenic fungi. **18**: 1228–1238.

Doering, T.L., Nosanchuk, J.D., Roberts, W.K., and Casadevall, A. (1999) Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. *Med Mycol* **37**: 175–81

Duin, D. van, Cleare, W., Zaragoza, O., Casadevall, A., and Nosanchuk, J.D. (2004) Effects of voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2014–20

Duo-Chuan, L. (2006) Review of Fungal Chitinases. *Mycopathologia* **161**: 345–360

Esher, S.K., Zaragoza, O., and Alspaugh, J.A. (2018) Cryptococcal pathogenic mechanisms: A dangerous trip from the environment to the brain. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **113**: 1–15.

Fonseca, F.L., Nimrichter, L., Cordero, R.J.B., Frases, S., Rodrigues, J., Goldman, D.L., *et al.* (2009) Role for chitin and chitoooligomers in the capsular architecture of *Cryptococcus*

neoformans. *Eukaryot Cell* **8**: 1543–53

Fox, D.S., Cruz, M.C., Sia, R.A.L., Ke, H., Cox, G.M., and Cardenas, M.E. (2001) Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12 - FK506 in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **39**.

Free, S.J. (2013) Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis. In *Advances in Genetics*. Elsevier, pp. 33–79

Fu, C., Donadio, N., Cardenas, M.E., and Heitman, J. (2018) Dissecting the Roles of the Calcineurin Pathway in Unisexual Reproduction, Stress Responses, and Virulence in *Cryptococcus deneoformans*. *Genetics* **208**: 639–653

Fuchs, B.B., Tang, R.J., and Mylonakis, E. (2007) The temperature-sensitive role of *Cryptococcus neoformans* ROM2 in cell morphogenesis. *PLoS One* **2**: e368

García-Pedrajas, M.D., Nadal, M., Kapa, L.B., Perlin, M.H., Andrews, D.L., and Gold, S.E. (2008) DelsGate, a robust and rapid gene deletion construction method. *Fungal Genet Biol* **45**: 379–388.

García-Rodas, R., and Zaragoza, O. (2012) Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **64**: 147–161

Gerik, K.J., Bhimireddy, S.R., Ryerse, J.S., Specht, C.A., and Lodge, J.K. (2008) PKC1 is essential for protection against both oxidative and nitrosative stresses, cell integrity, and normal manifestation of virulence factors in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **7**: 1685–98

Gerik, K.J., Donlin, M.J., Soto, C.E., Banks, A.M., Banks, I.R., Maligie, M.A., *et al.* (2005) Cell wall integrity is dependent on the PKC1 signal transduction pathway in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **58**: 393–408

Ghannoum, M.A. (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **13**: 122–43.

Gonzalez-Hilarion, S., Paulet, D., Lee, K.T., Hon, C.C., Lechat, P., Mogensen, E., *et al.* (2016) Intron retention-dependent gene regulation in *Cryptococcus neoformans*. *Sci Rep* **6**.

Gow, N.A.R., Latge, J.-P., and Munro, C.A. (2017) The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function.

Grützmann, K., Szafranski, K., Pohl, M., Voigt, K., Petzold, A., and Schuster, S. (2014) Fungal alternative splicing is associated with multicellular complexity and virulence: A genome-wide multi-species study. *DNA Res* **21**: 27–39

Hanna, J., Waterman, D., Isasa, M., Elsasser, S., Shi, Y., Gygi, S., and Finley, D. (2013) Cuz1/Ynl155w, a Zinc-dependent Ubiquitin-binding Protein, Protects Cells from Metalloid-induced Proteotoxicity *. *J Biol Chem* **289**: 1876–1885

Heinisch, J.J., and Rodicio, R. (2018) Protein kinase C in fungi—more than just cell wall integrity. *FEMS Microbiol Rev* **42**

Janbon, G. (2018) Introns in *Cryptococcus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro* **113**: 1–4

Janbon, G., Ormerod, K.L., Paulet, D., Byrnes, E.J., Yadav, V., Chatterjee, G., *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 Genet* **10**: e1004261
- Kartsonis, N.A., Nielsen, J., and Douglas, C.M. (2003) Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. *Drug Resist Updat* **6**: 197–218
- Kechichian, T.B., Shea, J., and Poeta, M. Del (2007) Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. *Infect Immun* **75**: 4792–8
- Kim, S., Hu, J., Oh, Y., Park, J., Choi, J., Lee, Y.-H., *et al.* (2010) Combining ChIP-chip and Expression Profiling to Model the MoCRZ1 Mediated Circuit for Ca²⁺/Calcineurin Signaling in the Rice Blast Fungus. *PLoS Pathog* **6**: e1000909
- Kmetzsch, L., Staats, C.C., Cupertino, J.B., Fonseca, F.L., Rodrigues, M.L., Schrank, A., and Vainstein, M.H. (2013) The calcium transporter Pmc1 provides Ca²⁺ tolerance and influences the progression of murine cryptococcal infection. *FEBS J* **280**: 4853–4864.
- Kock, C., Dufrière, Y.F., and Heinisch, J.J. (2015) Up against the Wall: Is Yeast Cell Wall Integrity Ensured by Mechanosensing in Plasma Membrane Microdomains? *Appl Environ Microbiol* **81**: 806–811
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., and Yanagawa, H. (2009) Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs.
- Kozubowski, L., Aboobakar, E.F., Cardenas, M.E., and Heitman, J. (2011) Calcineurin colocalizes with P-bodies and stress granules during thermal stress in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **10**: 1396–1402.
- Kwon-chung, K.J., Fraser, J.A., Doering, T.L., Wang, Z.A., Janbon, G., Idnurm, A., and Bahn, Y. (2016) *gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect* 1–28
- Lam, W.C., Gerik, K.J., and Lodge, J.K. (2013) Role of *Cryptococcus neoformans* Rho1 GTPases in the PKC1 signaling pathway in response to thermal stress. *Eukaryot Cell* **12**: 118–31
- Lee, H., Khanal Lamichhane, A., Garraffo, H.M., Kwon-Chung, K.J., and Chang, Y.C. (2012) Involvement of PDK1, PKC and TOR signalling pathways in basal fluconazole tolerance in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **84**: 130–146
- Lenardon, M.D., Munro, C.A., and Gow, N.A.R. (2010) Chitin synthesis and fungal pathogenesis. 416–423.
- Lev, S., Desmarini, D., Chayakulkeeree, M., Sorrell, T.C., and Djordjevic, J.T. (2012) The Crz1/Sp1 Transcription Factor of *Cryptococcus neoformans* Is Activated by Calcineurin and Regulates Cell Wall Integrity. *PLoS One* **7**.
- Lin, X., and Heitman, J. (2006) The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Annu Rev Microbiol* **60**: 69–105
- Liu, L., Tewari, R.P., and Williamson, P.R. (1999) Laccase protects *Cryptococcus*

- neoformans from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infect Immun* **67**: 6034–9 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10531264>. Accessed January 16, 2019.
- Liu, S., Hou, Y., Liu, W., Lu, C., Wang, W., and Sun, S. (2015) Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. *Eukaryot Cell* **14**: 324–334.
- Liu, T.-B., Perlin, D.S., and Xue, C. (2012) Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. *Virulence* **3**: 173–181 <http://dx.doi.org/10.4161/viru.18685>. Accessed January 29, 2019.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**: 402–408
- Martinez, L.R., and Casadevall, A. (2006) Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 1021–33
- Maziarz, E.K., Perfect, J.R., and Health, I. (2018) HHS Public Access. **30**: 179–206.
- Montes, H.M., Levitz, S., and Casadevall, A. (2016) *Cryptococcus neoformans* : Tripping on Acid in the Phagolysosome. **7**: 1–9.
- Noverr, M.C., Cox, G.M., Perfect, J.R., and Huffnagle, G.B. (2003) Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. *Infect Immun* **71**: 1538–47
- Odom, a, Muir, S., Lim, E., Toffaletti, D.L., Perfect, J., and Heitman, J. (1997a) Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J* **16**: 2576–2589.
- Odom, A., Muir, S., Lim, E., LToffaletti, D., Perfect, J., Heitman, J., and and, C. (1997b) Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans* factors have been identified (including capsule production, mating type, prototrophy, phenoloxidase activity and man.
- Okagaki, L.H., Strain, A.K., Nielsen, J.N., Charlier, C., Baltes, N.J., Chrétien, F., *et al.* (2010) Cryptococcal Cell Morphology Affects Host Cell Interactions and Pathogenicity. *PLoS Pathog* **6**: e1000953
- Olszewski, M.A., Noverr, M.C., Chen, G.-H., Toews, G.B., Cox, G.M., Perfect, J.R., and Huffnagle, G.B. (2004) Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *Am J Pathol* **164**: 1761–71
- Onyewu, C., Wormley, F.L., Perfect, J.R., Heitman, J., and Heitman, J. (2004) The calcineurin target, Crz1, functions in azole tolerance but is not required for virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* **72**: 7330–3
- Prado, M., Barbosa Da Silva, M., Laurenti, R., Travassos, L.R., and Taborda, C.P. (2009) Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006.
- Pukkila-Worley, R., Gerrald, Q.D., Kraus, P.R., Boily, M.-J., Davis, M.J., Giles, S.S., *et al.* (2005) Transcriptional Network of Multiple Capsule and Melanin Genes Governed by the

Cryptococcus neoformans Cyclic AMP Cascade. *Eukaryot Cell* **4**: 190–201
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15643074>. Accessed January 16, 2019.

Rajasingham, R., Smith, R.M., Park, B.J., Jarvis, J.N., Govender, N.P., Chiller, T.M., *et al.* (2017a) Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis* **17**: 873–881

Rodrigues, J., Ramos, C.L., Frases, S., Da, R.M., Godinho, C., Fonseca, F.L., and Rodrigues, M.L. (2018) Lack of chitin synthase genes impacts capsular architecture and cellular physiology in *Cryptococcus neoformans*. *Cell Surf* **2**: 14–23

Rodríguez-Kessler, M., Baeza-Montañez, L., García-Pedrajas, M.D., Tapia-Moreno, A., Gold, S., Jiménez-Bremont, J.F., and Ruiz-Herrera, J. (2012) Isolation of UmRrm75, a gene involved in dimorphism and virulence of *Ustilago maydis*. *Microbiol Res* **167**: 270–282

Roncero, C., and Duran, A. (1985) Effect of Calcofluor White and Congo Red on Fungal Cell Wall Morphogenesis: In Vivo Activation of Chitin Polymerization.

Sá-Moura, B., Funakoshi, M., Tomko, R.J., Dohmen, R.J., Wu, Z., Peng, J., and Hochstrasser, M. (2013) A conserved protein with AN1 zinc finger and ubiquitin-like domains modulates Cdc48 (p97) function in the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **288**: 33682–33696

Sabiiti, W., and May, R.C. (2012) Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Futur Microbiol* **7**: 1297–1313

Salas, S.D., Bennett, J.E., Kwon-Chung, K.J., Perfect, J.R., and Williamson, P.R. (1996) Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med* **184**: 377–86.

Santangelo, R., Zoellner, H., Sorrell, T., Wilson, C., Donald, C., Djordjevic, J., *et al.* (2004) Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. *Infect Immun* **72**: 2229–39

Schneider, R. de O., Fogaça, N. de S.S., Kmetzsch, L., Schrank, A., Vainstein, M.H., and Staats, C.C. (2012) Zap1 Regulates Zinc Homeostasis and Modulates Virulence in *Cryptococcus gattii*. *PLoS One* **7**: e43773

Schumacher, J., Larrinoa, I.F. de, and Tudzynski, B. (2008) Calcineurin-Responsive Zinc Finger Transcription Factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* Is Required for Growth, Development, and Full Virulence on Bean Plants. *Eukaryot Cell* **7**: 584–601

Scott, M.S., Troshin, P. V, and Barton, G.J. (2011) NoD: a Nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins.

Shen, G., Whittington, A., Song, K., and Wang, P. (2010) Pleiotropic function of intersectin homologue Cin1 in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **76**: 662–676

Smith, L.M., Dixon, E.F., and May, R.C. (2015) The fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* manipulates macrophage phagosome maturation. *Cell Microbiol* **17**: 702–713

Soriani, F.M., Malavazi, I., Silva Ferreira, M.E. da, Savoldi, M., Zeska Kress, M.R. Von, Souza Goldman, M.H. de, *et al.* (2008) Functional characterization of the *Aspergillus*

fumigatus CRZ1 homologue, CrzA. *Mol Microbiol* **67**: 1274–1291

Squizani, E.D., Oliveira, N.K., Reuwsaat, J.C.V., Marques, B.M., Lopes, W., Gerber, A.L., *et al.* (2018) Cryptococcal dissemination to the central nervous system requires the vacuolar calcium transporter Pmc1. *Cell Microbiol* **20**: 1–13.

Stajich, J.E., Dietrich, F.S., and Roy, S.W. (2007) Comparative genomic analysis of fungal genomes reveals intron-rich ancestors. *Genome Biol* **8**: R223

Steenbergen, J.N., and Casadevall, A. (2003) The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect* **5**: 667–75

Tanaka, Y., Sasaki, M., Ito, F., Aoyama, T., Sato-Okamoto, M., Takahashi-Nakaguchi, A., *et al.* (2016) KRE5 Suppression Induces Cell Wall Stress and Alternative ER Stress Response Required for Maintaining Cell Wall Integrity in *Candida glabrata*.

Tang, R.J., Breger, J., Idnurm, A., Gerik, K.J., Lodge, J.K., Heitman, J., *et al.* (2005) *Cryptococcus neoformans* Gene Involved in Mammalian Pathogenesis Identified by a *Caenorhabditis elegans* Progeny-Based Approach. *Infect Immun* **73**: 8219–8225

Taylor-Smith, L.M., and May, R.C. (2016) New weapons in the *Cryptococcus* infection toolkit. *Curr Opin Microbiol* **34**: 67–74

Teng, J., Iida, K., Imai, A., Nakano, M., Tada, T., and Iida, H. (2013) Hyperactive and hypoactive mutations in Cch1, a yeast homologue of the voltage-gated calcium-channel pore-forming subunit. *Microbiology* **159**: 970–979

Thinyane, K.H., Motsemme, K.M., and Cooper, V.J.L. (2015) Clinical Presentation, Aetiology, and Outcomes of Meningitis in a Setting of High HIV and TB Prevalence. *J Trop Med* **2015**: 1–7

Valdivia, R.H., and Schekman, R. (2003) The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. **100**: 1–6.

Vartivarian, S.E., Anaissie, E.J., Cowart, R.E., Sprigg, H.A., Tingler, M.J., and Jacobson, E.S. (1993) Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *J Infect Dis* **167**: 186–90

Vu, K., Eigenheer, R.A., Phinney, B.S., and Gelli, A. (2013) *Cryptococcus neoformans* promotes its transmigration into the central nervous system by inducing molecular and cellular changes in brain endothelial cells. *Infect Immun* **81**: 3139–47

Wong Sak Hoi, J., and Dumas, B. (2010) Ste12 and Ste12-Like Proteins, Fungal Transcription Factors Regulating Development and Pathogenicity. *Eukaryot Cell* **9**: 480–485

Wright, L.C., Santangelo, R.M., Ganendren, R., Payne, J., Djordjevic, J.T., and Sorrell, T.C. (2007) Cryptococcal Lipid Metabolism: Phospholipase B1 Is Implicated in Transcellular Metabolism of Macrophage-Derived Lipids. *Eukaryot Cell* **6**: 37–47

Zaragoza, O., Chrisman, C.J., Castelli, M.V., Frases, S., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J.L., and Casadevall, A. (2008) Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival.

Figure legends

Figure 1: Alignment of the two And1 protein sequences. Highlighted in blue, the AN1-like Zinc Finger domains; in green, the NLS site; in red, the NoLS site.

Figure 2: The expression levels of the *AND1* transcripts are affected by disturbances in the calcineurin pathway. The relative expression levels of *AND1_T1* and *AND1_T2* were normalized according to the expression levels of *Actin* (CNAG_00483). Error bars indicate SD. Mean values were compared with WT using one-way analysis of variance with Tukey's post hoc test. * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$.

Figure 3: The lack of *AND1* does not influence growth upon osmotic stress. Ten-fold serial dilutions of WT and *and1* Δ mutant strain cell suspensions were plated onto YPD 1X agar containing NaCl (1.5 M) and KCl (1 and 1.5 M). The plates were incubated for 2 days at 30 and 37 °C. Control samples consisted of cells grown in YPD agar only.

Figure 4: Membrane stress do not alter *and1* Δ growth comparing with WT. Ten-fold serial dilutions of WT and *and1* Δ mutant strain cell suspensions were plated onto YPD 1X agar containing SDS (0.005, 0.01, 0.02%). The plates were incubated for 2 days at 30 and 37 °C. Control samples consisted of cells grown in YPD agar only.

Figure 5: Disruption of *AND1* does not influence growth under oxidative stress. Ten-fold serial dilutions of WT and *and1* Δ mutant strain cell suspensions were plated onto YPD 1X agar containing H₂O₂ (5 mM). The plates were incubated for 2 days at 30 and 37 °C. Control samples consisted of cells grown in YPD agar only.

Figure 6: The lack of *AND1* does not cause sensibility to Ca²⁺/calcineurin related stresses. Ten-fold serial dilutions of WT and *and1* Δ mutant strain cell suspensions were plated onto YPD 1X agar containing CaCl₂ (100, 200 and 400 mM) (A); or FK506 (0.5 and 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (B). The plates were incubated for 2 days at 30 and 37 °C. Control samples consisted of cells grown in YPD agar only.

Figure 7: *And1* is required for growth upon cell wall stressors. Ten-fold serial dilutions of WT and *and1* Δ mutant strain cell suspensions were plated onto YPD 1X agar containing Congo Red (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) or Calcofluor White (CFW) (0.3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (A), or YPD 0.5X agar containing Congo Red (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (B). The plates were incubated for 2 days at 30 and 37 °C. Control samples consisted of cells grown in YPD agar only.

Figure 8: Disruption of *AND1* does not affect the capsular development. India ink counterstaining. Capsule measurements were determined in *C. neoformans* cultures incubated in minimal medium at 30 °C.

Figure 9: The *and1Δ* displays alterations in the expression levels of chitin synthase genes. The relative expression levels of *CSH2*, *CSH3*, *CSH4*, *CSH5*, *CSH6* and *CSH8* were normalized according to the expression levels of *Actin* (CNAG_00483). Error bars indicate SD. Mean values were compared with WT using one-way analysis of variance with Tukey's post hoc test. * $p < 0.05$, **** $p < 0.001$.

Figure 10: Disruption of *AND1* affects the expression levels of chitinase genes. The relative expression levels of *CHI2*, *CHI21*, *CHI22* and *CHI4* were normalized according to the expression levels of *Actin* (CNAG_00483). Error bars indicate SD. Mean values were compared with WT using one-way analysis of variance with Tukey's post hoc test. * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$.

Figure 11: *And1* is required for the proper expression of *PKC1*. The relative expression levels of *FSK1*, *PKC1* and *RLM1* were normalized according to the expression levels of *Actin* (CNAG_00483). Error bars indicate SD. Mean values were compared with WT using one-way analysis of variance with Tukey's post hoc test. ** $p < 0.01$.

Figure 12: Macrophage interaction ability is not influenced by the deletion of *AND1*. Cells of WT, *and1Δ* and *and1::AND1* were incubated with murine macrophage cells J774.A1. The phagocytosis index (A) and the IPR (B) was determined by Colony Forming Units (CFU) count after 2 and 24 h of interaction, respectively. Mean values were compared with wild-type (WT) using one-way analysis of variance with Tukey's post hoc test.

Figures

Figure 1

```

      *          20          *          40          *          60          *          80
T1 : MATPSPDSKSEMMFLGQECNHPACYLHDFLFFDCPACHLAFCQPHFLPSQHSCTAPI PASMVDRIAPTCPMCNEIVPYPKSMDE : 84
T2 : MATPSPDSKSEMMFLGQECNHPACYLHDFLFFDCPACHLAFCQPHFLPSQHSCTAPI PASMVDRIAPTCPMCNEIVPYPKSMDE : 84
      MATPSPDSKSEMMFLGQECNHPACYLHDFLFFDCPACHLAFCQPHFLPSQHSCTAPLPASMVDRIAPTCPMCNEIVPYPKSMDE

      *          100         *          120         *          140         *          160
T1 : NEAVERHILSGTCVGLQGGEERKKAEAKRRRDTGEVVCWKKSCGKVLVVKMKCESCQHVFPCPTHRHPTSHTCASNQTPSPSSSSSR : 168
T2 : NEAVERHILSGTCVGLQGGEERKKAEAKRRRDTGEVVCWKKSCGKVLVVKMKCESCQHVFPCPTHRHPTSHTCASNQTPSPSSSSSR : 168
      NEAVERHILSGTCVGLQGGEERKKAEAKRRRDTGEVVCWKKSCGKVLVVKMKCESCQHVFPCPTHRHPTSHTCASNQTPSPSSSSSR

      *          180         *          200         *          220         *          240         *
T1 : IGTPQTQATSRPASKAALSRLLPPSMQPPASAGASRPVPVKVNSANSNSSAPRPLAAPSGGNIGSSLDAKAAAAAAAFKRAGQ : 252
T2 : IGTPQTQATSRPASKAALSRLLPPSMQPPASAGASRPVPVKVNSANSNSSAPRPLAAPSGGNIGSSLDAKAAAAAAAFKRAGQ : 252
      IGTPQTQATSRPASKAALSRLLPPSMQPPASAGASRPVPVKVNSANSNSSAPRPLAAPSGGNIGSSLDAKAAAAAAAFKRAGQ

      260          *          280          *          300          *          320
T1 : DVKVPFVKSSAEKRTQAETNSQIQALKARHEKGLLTKTEQVREAELVGCREATRRTGDKSKNKDKDCVIA : 322
T2 : DVKVPFVKSSAEKRTQAETNSQIQALKARHEKGLLTKTEQVR----- : 294
      DVKVPFVKSSAEKRTQAETNSQIQALKARHEKGLLTKTEQV4

```

Figure 2

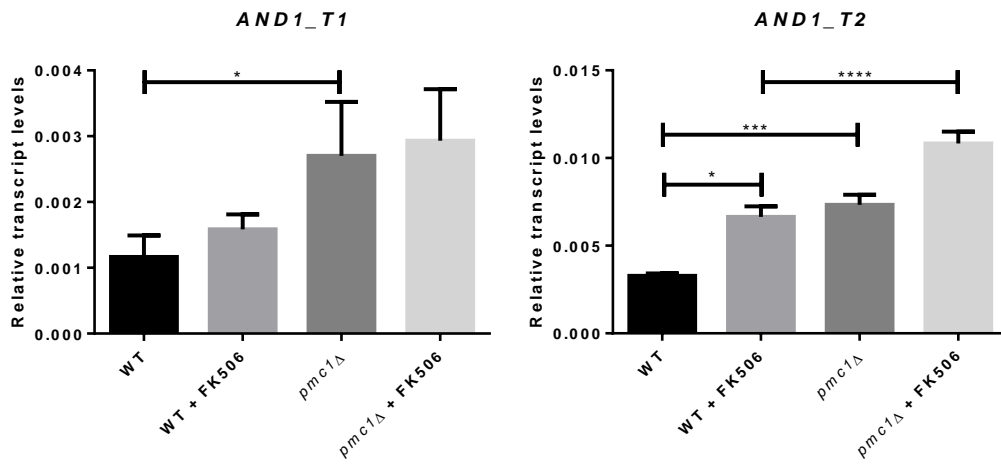


Figure 3

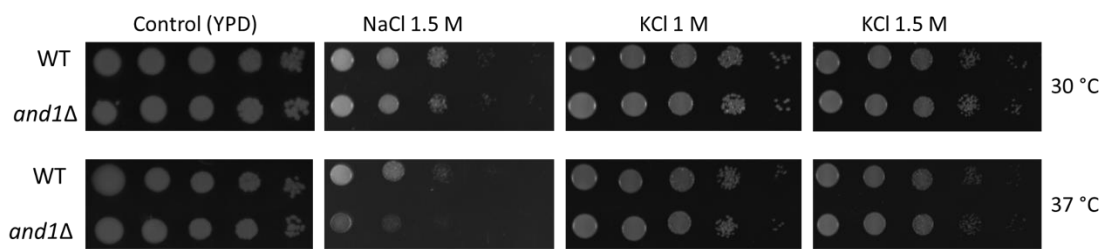


Figure 4

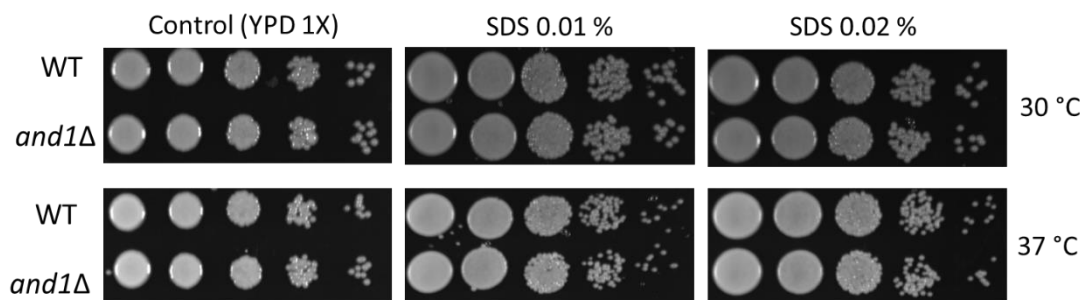


Figure 5

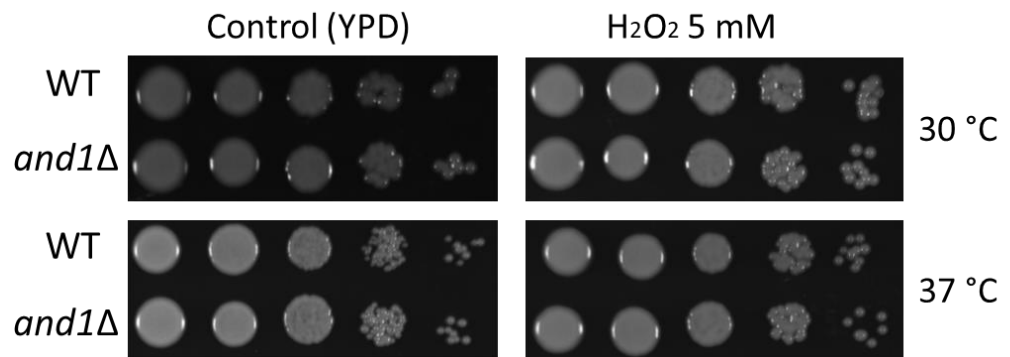


Figure 6

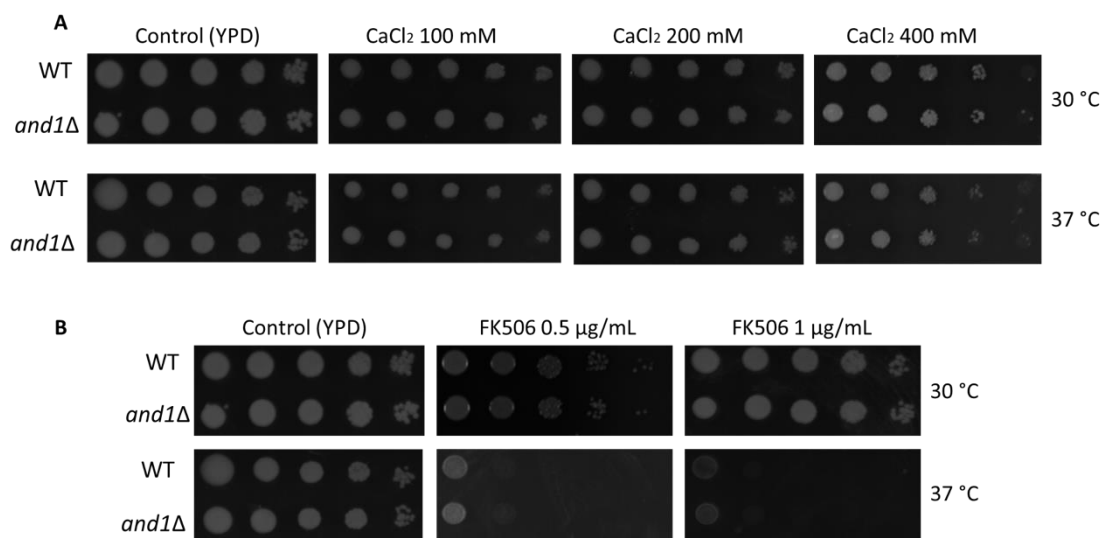


Figure 7

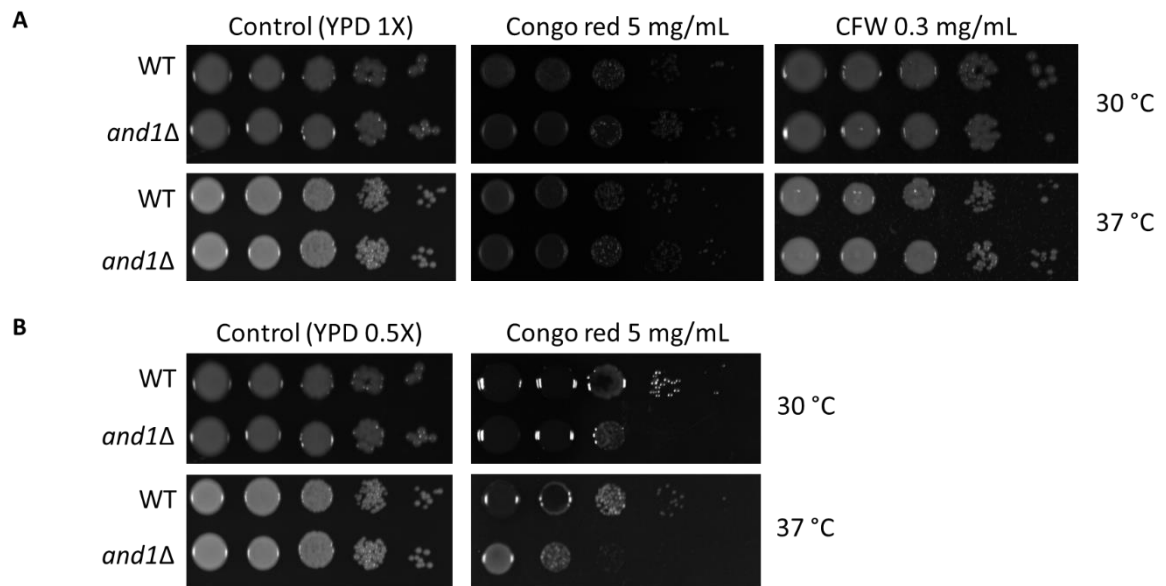


Figure 8

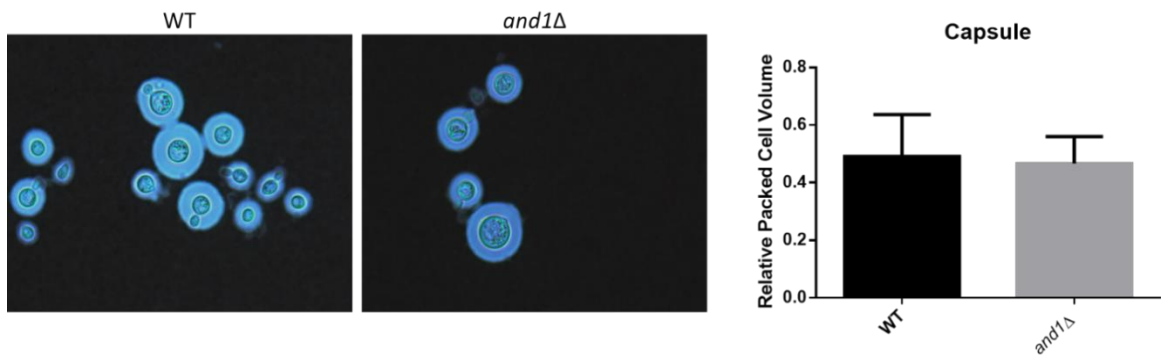


Figure 9

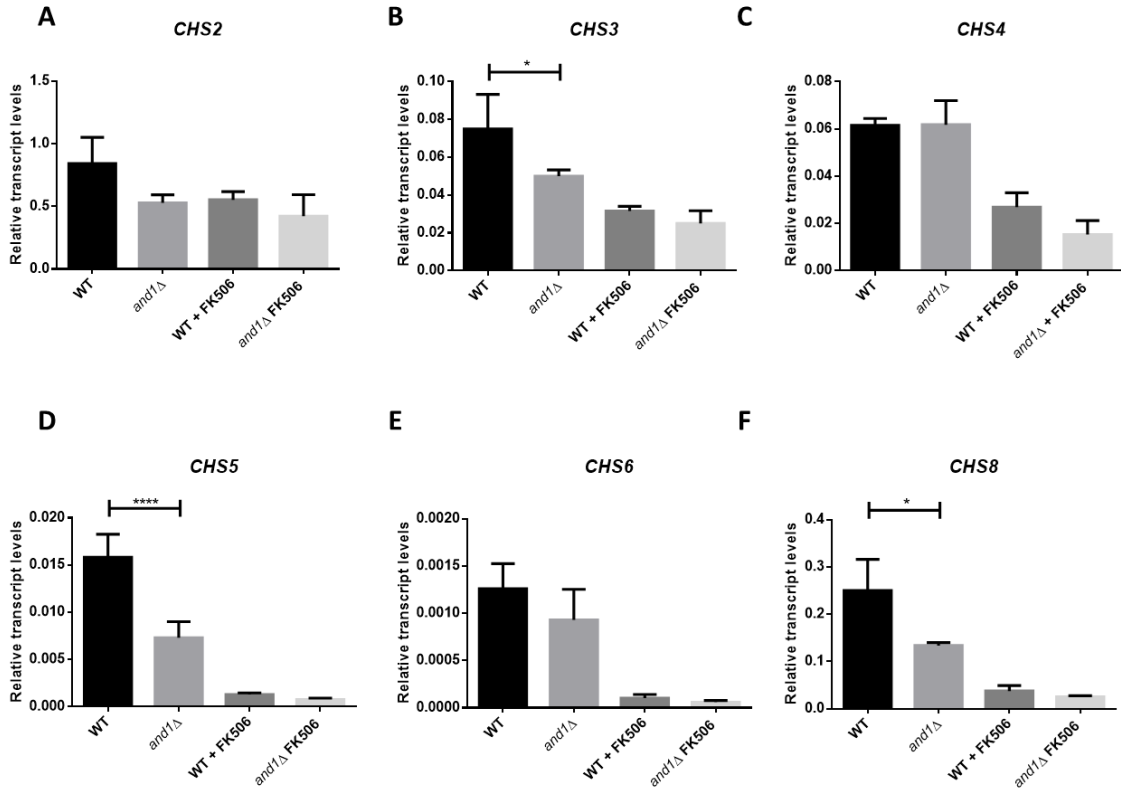


Figure 10

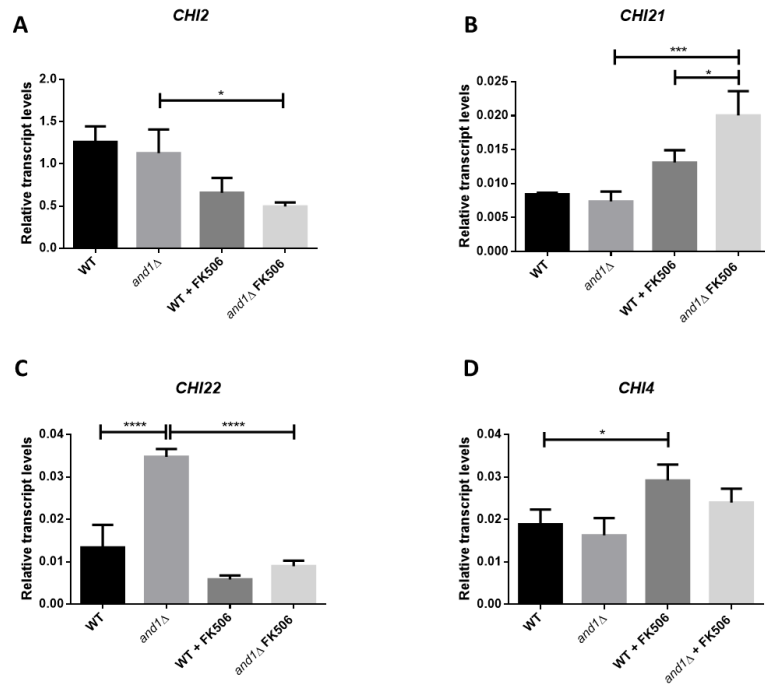


Figure 11

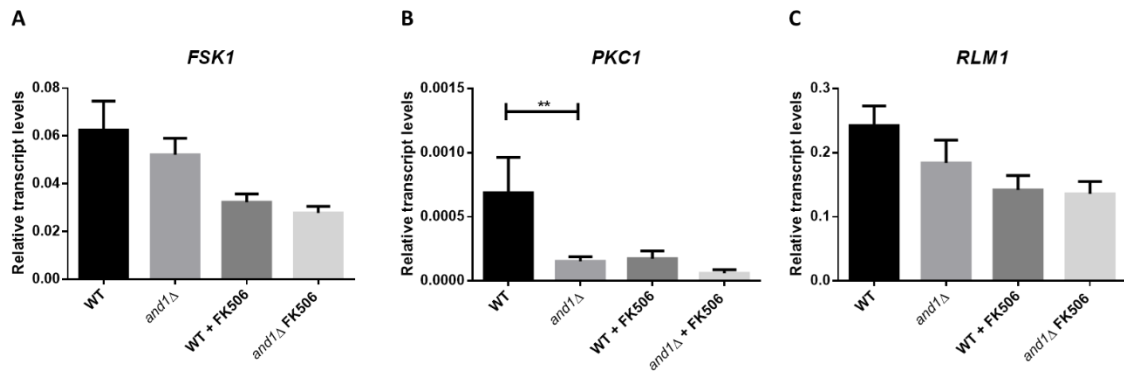
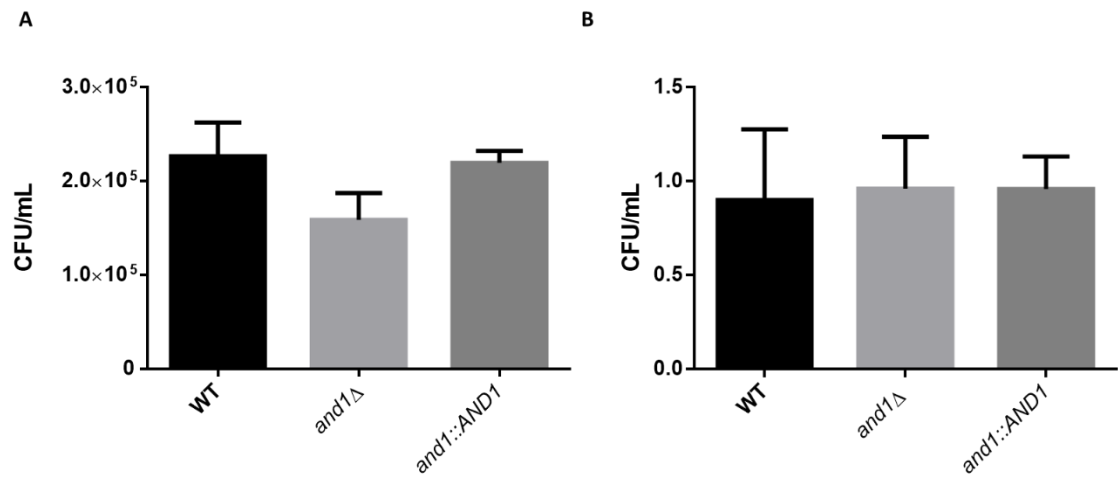


Figure 12



4. Discussão

Estudos globais de análise de genômica e transcritômica de *C. neoformans*, bem como o grande volume de dados gerados nestes estudos, tem possibilitado um rápido e apurado entendimento das estratégias de sobrevivência e disseminação desenvolvidas por este organismo. Por meio de abordagens globais, é possível identificar um perfil completo de respostas celulares desencadeadas por uma condição específica, além da construção e caracterização de genomas. Como consequência, estes estudos possibilitaram a identificação de novos genes e proteínas, assim como eventos não canônicos de transcrição e tradução (JANBON et al., 2014)

C. neoformans é uma levedura patogênica e, por isso, necessita desenvolver estratégias que a permitam sobreviver em ambientes e condições muito diversos. Esta característica reside na complexa e dinâmica estrutura transcricional, que determina a adaptação desta levedura às diferentes condições ambientais (JANBON, 2018). Uma das propriedades que identificam *C. neoformans* como uma levedura patogênica é a grande quantidade de íntrons em seu genoma. Dentre as espécies de fungo que possuem anotação genômica confiável, *C. neoformans* é o fungo que possui o maior número de íntrons. Em seu genoma, mais de 99% dos genes contem sequências intrônicas, ocorrendo com uma frequência de 3,35 íntrons a cada kilobase de sequência codificadora. A título de comparação, em *S. cerevisiae* apenas 283 genes apresentam íntrons (JANBON et al., 2014; STAJICH; DIETRICH; ROY, 2007).

A presença de um grande número de sequências intrônicas no genoma de *C. neoformans* possibilita diversificação na expressão de produtos transcricionais, por meio de eventos de *splicing* alternativo. *C. neoformans* também é o fungo com maior porcentagem de genes que produzem produtos transcricionais a partir de *splicing* alternativo, o que ocorre em aproximadamente 19% dos genes (GRÜTZMANN et al., 2014). Estudos tem demonstrado que eventos de *splicing* alternativo participam na regulação da virulência em fungos patogênicos (GRÜTZMANN et al., 2014; RODRÍGUEZ-KESSLER et al., 2012; SHEN et al., 2010; WONG SAK HOI; DUMAS, 2010). Além disso, foi demonstrado que o número de eventos de *splicing* alternativo está intimamente ligado à fase de crescimento da célula de *C. neoformans*, sendo a fase exponencial de crescimento celular à 30 °C onde ocorrem o maior número de eventos

(GONZALEZ-HILARION et al., 2016). Desta forma, o *splicing* alternativo possui um papel fundamental para o desenvolvimento e adaptação das células de *C. neoformans* nas diferentes condições ambientais.

Neste estudo, iniciamos a caracterização funcional do gene *AND1* em *C. neoformans*, que codifica dois produtos transcricionais originados de *splicing* alternativo: *AND1_T1* e *AND1_T2*. A sequência codificadora de *AND1_T1* é composta por cinco éxons e a de *AND1_T2*, por quatro éxons. Sítios de localização nuclear (SLN) foram identificados em ambos os transcritos. Um sítio de localização nucleolar (SLNo) foi detectado apenas no transcrito *AND1_T1*, e está localizado no único éxon que não é compartilhado entre os dois transcritos.

O nucléolo constitui uma região dentro do núcleo, na qual ocorre a biogênese das subunidades ribossomais, em células eucarióticas. Neste local, estão concentradas as maquinarias de transcrição e processamento que atuam na geração das subunidades do ribossomo (BOISVERT et al., 2007). A identificação de um SLNo presente em *And1_T1* fornece um indicativo de uma possível função para esta proteína identificada como hipotética, embora estudos mais aprofundados ainda serão necessários para o melhor entendimento do papel de *And1_T1* no nucléolo. Além disso, também permite a associação de funções distintas para cada um dos transcritos de *AND1*. Foram ainda observadas diferenças ao serem avaliados os níveis de expressão relativa dos transcritos, sob condição de inativação da via da calcineurina por FK506. Ambos *AND1_T1* e *AND1_T2* apresentaram níveis aumentados de expressão no mutante *pmc1Δ*, em relação à linhagem selvagem. Entretanto, apenas *AND1_T2* exibiu uma modificação no nível de expressão sob inativação de calcineurina, aumentando sua expressão relativa na presença de FK506.

Outra característica importante que compõe ambos os transcritos codificados por *AND1* é a presença do domínio *ANI-like zinc finger*. Em fungos, a grande maioria das proteínas que são constituídas por este domínio não possuem estudos caracterização funcional, e também são proteínas hipotéticas ou com função desconhecida. Em *S. cerevisiae*, o domínio *ANI-like zinc finger* foi identificado em duas proteínas: Cuz1 e Tmc1. Nesta levedura, estudos demonstraram o envolvimento de ambas como componentes do sistema de ubiquitinação, pela entrega de proteínas para degradação por Cdc48 e pelo proteossomo. Cuz1 e Tmc1 também estão associadas à resistência em

condições de estresse metalotóxico (HANNA et al., 2013; SÁ-MOURA et al., 2013). Em *C. neoformans*, o envolvimento de And1 com componentes do sistema de ubiquitinação ainda necessita ser avaliado.

Neste trabalho, realizamos a construção de uma linhagem mutante e complementada para o gene *AND1* em *C. neoformans*, a fim de avaliar possíveis alterações relacionadas à sua deleção. A linhagem mutante *and1Δ* demonstrou-se sensível ao crescimento sob condições de estresse de parede e choque hiposmótico, em relação à linhagem selvagem. Pela análise da expressão de genes envolvidos com a regulação da IPC, observamos que esta sensibilidade pode estar associada à uma limitada disponibilidade de quitina, nas células da linhagem *and1Δ*. Foi observado um decréscimo significativo na expressão relativa de três quitina sintases (*CHS3*, *CHS5* e *CHS8*), e um aumento na expressão da quitinase *CHI22*, na linhagem mutante. Também foi constatada a diminuição na expressão relativa de *PKC1*, gene codificador de uma proteína quinase, regulador chave da IPC.

Estudos recentes tem demonstrado uma comunicação entre a via de sinalização da calcineurina com a via de regulação da IPC (integridade da parede celular), mediada pelo fator de transcrição Crz1. Linhagens de *C. neoformans* que possuem a deleção de *CRZ1* apresentam fenótipos severos de sensibilidade ao crescimento em condições de estresse de parede (LEV et al., 2012). Além disso, foi demonstrado que Crz1 regula a expressão de genes envolvidos com a parede celular como quitina sintases, quitinases e glucanases (CHOW et al., 2017), mostrando que Crz1 também é um importante componente regulador da IPC. As observadas alterações na expressão dos transcritos *AND1_T1* e *AND1_T2* relacionadas com perturbações na via da calcineurina, bem como o fenótipo de sensibilidade identificado na linhagem *andΔ*, fornecem um indicativo de que, assim como Crz1, And1 pode também estar atuando como um comunicador entre as vias da calcineurina e IPC.

5. Conclusões

- Os transcritos *AND1_T1* e *AND1_T2*, codificados por *AND1*, apresentaram níveis relativos de expressão aumentados no mutante *pmc1Δ*;
- Os níveis de expressão relativa do transcrito *AND1_T2* são significativamente maiores quando há inativação da via da calcineurina, por FK506;
- O mutante *and1Δ* apresentou sensibilidade de crescimento na presença de Congo red em meio YPD 0,5X, condição que simula um estresse de parede juntamente com choque hiposmótico;
- O mutante *and1Δ* não apresenta deficiências na produção de cápsula polissacarídica;
- A deleção de *AND1* não interfere na capacidade fagocítica e proliferativa de *C. neoformans* em macrófagos;
- A expressão relativa das quitina sintases *CHS3*, *CHS5* e *CHS8* é significativamente menor no mutante *and1Δ*;
- A deleção de *AND1* causa um aumento significativo na expressão da quitinase *CHI22*;
- O mutante *and1Δ* apresentou uma diminuição significativa na expressão da proteína quinase *PKC1*;

6. Perspectivas

- Caracterizar individualmente os transcritos *AND_T1* e *AND_T2*, por meio da construção de linhagens de superexpressão em *C. neoformans*;
- Avaliar o conteúdo de quitina das linhagens *and1Δ* e WT, por citometria de fluxo;
- Avaliar a expressão relativa de outros genes que compõe a via de manutenção da IPC;

7. Referências

- ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, [s. l.], v. 150, p. 2029–2035, 2004.
- ADLER, A. et al. A Novel Specificity Protein 1 (SP1)-like Gene Regulating Protein Kinase C-1 (Pkc1)-dependent Cell Wall Integrity and Virulence Factors in *Cryptococcus neoformans* * □ S. [s. l.], 2011.
- AGUSTINHO, D. P. et al. Peeling the onion: the outer layers of *Cryptococcus neoformans*. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, [s. l.], v. 113, n. 7, p. 1–8, 2018.
- ALSPAUGH, J. A. Virulence Mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis; HHS Public Access. **Fungal Genet Biol**, [s. l.], v. 78, p. 55–58, 2015.
- BAKER, L. G.; SPECHT, C. A.; LODGE, J. K. Chitinases Are Essential for Sexual Development but Not Vegetative Growth in *Cryptococcus neoformans* †. **EUKARYOTIC CELL**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 1692–1705, 2009.
- BANKS, I. R. et al. A Chitin Synthase and Its Regulator Protein Are Critical for Chitosan Production and Growth of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans* †. **EUKARYOTIC CELL**, [s. l.], v. 4, n. 11, p. 1902–1912, 2005.
- BLASI, E. et al. Role of nitric oxide and melanogenesis in the accomplishment of anticryptococcal activity by the BV-2 microglial cell line. **Journal of neuroimmunology**, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 111–6, 1995.
- BOISVERT, F. M. et al. The multifunctional nucleolus. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 574–585, 2007.
- CHARLIER, C. et al. Capsule Structure Changes Associated with *Cryptococcus neoformans* Crossing of the Blood-Brain Barrier. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 166, n. 2, p. 421–432, 2005..
- CHEN, S. C. et al. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? **The Journal of infectious diseases**, [s. l.], v. 175, n. 2, p. 414–20, 1997.
- CHEN, S. H. M. et al. *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 52, n. 11, p. 961–970, 2003.
- CHOW, E. W. L. et al. Elucidation of the calcineurin-Crz1 stress response transcriptional network in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. [s. l.], p. 1–29, 2017.
- COX, G. M. et al. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 443–8, 2000..
- CUI, J. et al. Simulating calcium influx and free calcium concentrations in yeast. **Cell Calcium**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 123–132, 2009. a.

CUI, J. et al. Calcium homeostasis and signaling in yeast cells and cardiac myocytes. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 1137–1147, 2009. b.

DAVENPORT, K. R. et al. A Second Osmosensing Signal Transduction Pathway in Yeast HYPOTONIC SHOCK ACTIVATES THE PKC1 PROTEIN KINASE-REGULATED CELL INTEGRITY PATHWAY*. [s.l: s.n.].

DICHTL, K.; SAMANTARAY, S. Review Cell wall integrity signalling in human pathogenic fungi. [s. l.], v. 18, n. July, p. 1228–1238, 2016.

DOERING, T. L. et al. Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. **Medical mycology**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 175–81, 1999.

DUO-CHUAN, L. Review of Fungal Chitinases. **Mycopathologia**, [s. l.], v. 161, n. 6, p. 345–360, 2006.

ESHER, S. K.; ZARAGOZA, O.; ALSPAUGH, J. A. Cryptococcal pathogenic mechanisms: A dangerous trip from the environment to the brain. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 113, n. 7, p. 1–15, 2018.

FONSECA, F. L. et al. Role for chitin and chito oligomers in the capsular architecture of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 1543–53, 2009.

FOX, D. S. et al. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12 - FK506 in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 39, n. 4, 2001.

FREE, S. J. Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis. In: **Advances in Genetics**. 81. ed. [s.l.] : Elsevier, 2013. p. 33–79.

FU, C. et al. Dissecting the Roles of the Calcineurin Pathway in Unisexual Reproduction, Stress Responses, and Virulence in *Cryptococcus deneoformans*. **Genetics**, [s. l.], v. 208, n. 2, p. 639–653, 2018.

FUCHS, B. B.; TANG, R. J.; MYLONAKIS, E. The temperature-sensitive role of *Cryptococcus neoformans* ROM2 in cell morphogenesis. **PLoS one**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. e368, 2007.

GARCÍA-PEDRAJAS, M. D. et al. DelsGate, a robust and rapid gene deletion construction method. **Fungal Genetics and Biology**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 379–388, 2008.

GARCÍA-RODAS, R.; ZARAGOZA, O. Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 147–161, 2012.

GERIK, K. J. et al. Cell wall integrity is dependent on the PKC1 signal transduction pathway in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 393–408, 2005.

GERIK, K. J. et al. PKC1 is essential for protection against both oxidative and nitrosative

stresses, cell integrity, and normal manifestation of virulence factors in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 1685–98, 2008.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical microbiology reviews**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 122–43, table of contents, 2000.

GONZALEZ-HILARION, S. et al. Intron retention-dependent gene regulation in *Cryptococcus neoformans*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, 2016.

GOW, N. A. R.; LATGE, J.-P.; MUNRO, C. A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. [s. l.], 2017.

GRÜTZMANN, K. et al. Fungal alternative splicing is associated with multicellular complexity and virulence: A genome-wide multi-species study. **DNA Research**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 27–39, 2014.

HANNA, J. et al. Cuz1/Ynl155w, a Zinc-dependent Ubiquitin-binding Protein, Protects Cells from Metalloid-induced Proteotoxicity *. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 289, p. 1876–1885, 2013.

HEINISCH, J. J.; RODICIO, R. Protein kinase C in fungi—more than just cell wall integrity. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 42, n. 1, 2018.

JAIN, N.; FRIES, B. C. Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Mycopathologia**, [s. l.], v. 166, n. 4, p. 181–8, 2008.

JANBON, G. et al. Analysis of the Genome and Transcriptome of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* Reveals Complex RNA Expression and Microevolution Leading to Virulence Attenuation. **PLoS Genetics**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. e1004261, 2014.

JANBON, G. Introns in *Cryptococcus*. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, [s. l.], v. 113, n. 7, p. 1–4, 2018.

KARTSONIS, N. A.; NIELSEN, J.; DOUGLAS, C. M. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. **Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 197–218, 2003.

KECHICHIAN, T. B.; SHEA, J.; DEL POETA, M. Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 75, n. 10, p. 4792–8, 2007.

KIM, S. et al. Combining ChIP-chip and Expression Profiling to Model the MoCRZ1 Mediated Circuit for Ca²⁺/Calcineurin Signaling in the Rice Blast Fungus. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. e1000909, 2010.

KMETZSCH, L. et al. The calcium transporter Pmc1 provides Ca²⁺ tolerance and influences the progression of murine cryptococcal infection. **FEBS Journal**, [s. l.], v. 280, n. 19, p. 4853–4864, 2013.

KOCK, C.; DUFRENE, Y. F.; HEINISCH, J. J. Up against the Wall: Is Yeast Cell Wall Integrity Ensured by Mechanosensing in Plasma Membrane Microdomains? **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 81, n. 3, p. 806–811, 2015.

KOSUGI, S. et al. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. **BIOPHYSICS AND COMPUTATIONAL BIOLOGY**. [s.l: s.n.].

KOZUBOWSKI, L. et al. Calcineurin colocalizes with P-bodies and stress granules during thermal stress in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 1396–1402, 2011.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **Cold Spring Harbor Perspectives**, [s. l.], p. 1–28, 2016.

LAM, W. C.; GERIK, K. J.; LODGE, J. K. Role of *Cryptococcus neoformans* Rho1 GTPases in the PKC1 signaling pathway in response to thermal stress. **Eukaryotic cell**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 118–31, 2013.

LEE, H. et al. Involvement of PDK1, PKC and TOR signalling pathways in basal fluconazole tolerance in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 130–146, 2012.

LENARDON, M. D.; MUNRO, C. A.; GOW, N. A. R. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. [s. l.], n. Figure 1, p. 416–423, 2010.

LEV, S. et al. The Crz1/Sp1 Transcription Factor of *Cryptococcus neoformans* Is Activated by Calcineurin and Regulates Cell Wall Integrity. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 12, 2012.

LIN, X.; HEITMAN, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 60, p. 69–105, 2006.

LIU, L.; TEWARI, R. P.; WILLIAMSON, P. R. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 67, n. 11, p. 6034–9, 1999.

LIU, S. et al. Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 324–334, 2015. a.

LIU, T.-B.; PERLIN, D. S.; XUE, C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. **Virulence**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 173–181, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s. l.], v.

50, n. 3, p. 1021–33, 2006.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R.; HEALTH, I. HHS Public Access. [s. l.], v. 30, n. 1, p. 179–206, 2018.

MONTES, H. M.; LEVITZ, S.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* : Tripping on Acid in the Phagolysosome. [s. l.], v. 7, n. February, p. 1–9, 2016.

NOVERR, M. C. et al. Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 1538–47, 2003.

ODOM, A et al. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **The EMBO journal**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 2576–2589, 1997. a.

OKAGAKI, L. H. et al. Cryptococcal Cell Morphology Affects Host Cell Interactions and Pathogenicity. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. e1000953, 2010.

OLSZEWSKI, M. A. et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **The American journal of pathology**, [s. l.], v. 164, n. 5, p. 1761–71, 2004.

ONYEWU, C. et al. The calcineurin target, Crz1, functions in azole tolerance but is not required for virulence of *Candida albicans*. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 72, n. 12, p. 7330–3, 2004.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. [s.l: s.n.]. €

PUKKILA-WORLEY, R. et al. Transcriptional Network of Multiple Capsule and Melanin Genes Governed by the *Cryptococcus neoformans* Cyclic AMP Cascade. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 190–201, 2005.

RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 17, p. 873–881, 2017. a.

RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet. Infectious diseases**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 873–881, 2017. b.

RODRIGUES, J. et al. Lack of chitin synthase genes impacts capsular architecture and cellular physiology in *Cryptococcus neoformans*. **The Cell Surface**, [s. l.], v. 2, p. 14–23, 2018.

RODRÍGUEZ-KESSLER, M. et al. Isolation of UmRrm75, a gene involved in dimorphism and virulence of *Ustilago maydis*. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 167, n. 5, p. 270–282, 2012.

RONCERO, C.; DURAN, A. Effect of Calcofluor White and Congo Red on Fungal Cell

Wall Morphogenesis: In Vivo Activation of Chitin Polymerization. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**. [s.l: s.n.].

SÁ-MOURA, B. et al. A conserved protein with AN1 zinc finger and ubiquitin-like domains modulates Cdc48 (p97) function in the ubiquitin-proteasome pathway. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 288, n. 47, p. 33682–33696, 2013.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiol**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 1297–1313, 2012.

SALAS, S. D. et al. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of experimental medicine**, [s. l.], v. 184, n. 2, p. 377–86, 1996.

SANTANGELO, R. et al. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 72, n. 4, p. 2229–39, 2004.

SCHNEIDER, R. de O. et al. Zap1 Regulates Zinc Homeostasis and Modulates Virulence in *Cryptococcus gattii*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. e43773, 2012.

SCHUMACHER, J.; DE LARRINOA, I. F.; TUDZYNSKI, B. Calcineurin-Responsive Zinc Finger Transcription Factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* Is Required for Growth, Development, and Full Virulence on Bean Plants. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 584–601, 2008.

SCOTT, M. S.; TROSHIN, P. V; BARTON, G. J. **NoD: a Nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins**. [s.l: s.n.].

SHEN, G. et al. Pleiotropic function of intersectin homologue Cin1 in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 76, n. 3, p. 662–676, 2010.

SMITH, L. M.; DIXON, E. F.; MAY, R. C. The fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* manipulates macrophage phagosome maturation. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 702–713, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25394938>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

SORIANI, F. M. et al. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 67, n. 6, p. 1274–1291, 2008.

SQUIZANI, E. D. et al. Cryptococcal dissemination to the central nervous system requires the vacuolar calcium transporter Pmc1. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 1–13, 2018.

STAJICH, J. E.; DIETRICH, F. S.; ROY, S. W. Comparative genomic analysis of fungal genomes reveals intron-rich ancestors. **Genome Biology**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. R223, 2007.

STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes and infection**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 667–75, 2003.

TANAKA, Y. et al. KRE5 Suppression Induces Cell Wall Stress and Alternative ER Stress Response Required for Maintaining Cell Wall Integrity in *Candida glabrata*. [s. l.], 2016. Disponível em: <<http://www.genolevures.org/>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

TANG, R. J. et al. *Cryptococcus neoformans* Gene Involved in Mammalian Pathogenesis Identified by a *Caenorhabditis elegans* Progeny-Based Approach. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 73, n. 12, p. 8219–8225, 2005.

TAYLOR-SMITH, L. M.; MAY, R. C. New weapons in the *Cryptococcus* infection toolkit. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 34, n. Figure 1, p. 67–74, 2016.

TENG, J. et al. Hyperactive and hypoactive mutations in Cch1, a yeast homologue of the voltage-gated calcium-channel pore-forming subunit. **Microbiology**, [s. l.], v. 159, n. Pt_5, p. 970–979, 2013.

THINYANE, K. H.; MOTSEMME, K. M.; COOPER, V. J. L. Clinical Presentation, Aetiology, and Outcomes of Meningitis in a Setting of High HIV and TB Prevalence. **Journal of Tropical Medicine**, [s. l.], v. 2015, p. 1–7, 2015.

VALDIVIA, R. H.; SCHEKMAN, R. The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. [s. l.], v. 100, n. 18, p. 1–6, 2003.

VAN DUIN, D. et al. Effects of voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s. l.], v. 48, n. 6, p. 2014–20, 2004.

VARTIVARIAN, S. E. et al. Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. **The Journal of infectious diseases**, [s. l.], v. 167, n. 1, p. 186–90, 1993.

VU, K. et al. *Cryptococcus neoformans* promotes its transmigration into the central nervous system by inducing molecular and cellular changes in brain endothelial cells. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 81, n. 9, p. 3139–47, 2013.

WONG SAK HOI, J.; DUMAS, B. Ste12 and Ste12-Like Proteins, Fungal Transcription Factors Regulating Development and Pathogenicity. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 480–485, 2010.

WRIGHT, L. C. et al. Cryptococcal Lipid Metabolism: Phospholipase B1 Is Implicated in Transcellular Metabolism of Macrophage-Derived Lipids. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 37–47, 2007.

ZARAGOZA, O. et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 2043–2057, 2008.