

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA - CBiot

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR –
PPGBCM

**INFLUÊNCIA DA ALTERAÇÃO DOS NÍVEIS DE FERRO E COBRE NA FISIOLOGIA
E PATOGENICIDADE DE *Cryptococcus gattii*: UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA**

Tese de Doutorado

Juliana Crestani

Porto Alegre, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA - CBiot

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR –
PPGBCM

**INFLUÊNCIA DA ALTERAÇÃO DOS NÍVEIS DE FERRO E COBRE NA FISIOLOGIA
E PATOGENICIDADE DE *Cryptococcus gattii*: UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA**

Tese 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 Doutor em Ciências.

Juliana Crestani

Orientadora: Prof^a. Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, 2011.

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, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Bolsa de doutorado, processo n°. 142799/2007-6), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal para o Ensino Superior (CAPES) e pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). Parte deste trabalho foi realizado no “Proteomic Mass Spectrometry Laboratory”, no “Department of Chemical Physiology, The Scripps Research Institute”, La Jolla-CA, sob supervisão do Dr. John R Yates III, através de um Doutorado-Sanduiche financiado pelo CNPq (processo n°. 201227/2009-6).

Dedicatória

*Aos meus pais, José e Lourdes; minhas irmãs,
Eliete e Ilene; e meu sobrinho, Alex; por me
mostrarem na vida o valor maior de “ser” e
“conhecer”, antes de “ter”!*

*Ao meu noivo, Alexandre; por traduzir o amor e a
cumplicidade necessários para se desejar viver
junto a alguém além dessa existência!*

Agradecimento Especial

À minha orientadora, Marilene H. Vainstein, por ter acreditado em meu trabalho, desde o início. E, por acima de tudo, acreditar na minha pessoa e confiar na minha formação.

Agradeço a você, Marilene, por insistir na minha capacidade, por nunca ter permitido que eu fosse vítima das situações, por me forçar a aprender, por me forçar a evoluir. Hoje posso dizer que evoluí, graças a você. Você acreditou em mim e por isso eu consegui me tornar a profissional que sou, a pessoa forte que sou.

Muito obrigada!!!

Agradecimentos

Aos professores, Arnaldo Zaha e Augusto Schrank, membros da comissão de acompanhamento, pelas sugestões e pelo grande aprendizado disponibilizado.

Aos demais professores do PPGBCM, pelo ensinamento e pela dedicação a nós, alunos.

Ao meu supervisor de doutorado-sanduíche, Dr. John Yates, pelo exemplo de profissionalismo e humildade.

As irmãs e aos irmãos que a vida me deu: Letícia Goulart, Lis Ribeiro Müller, Melissa Landell, Carolina Silveira, Lívia Rosa e Silva, Charley Staats, Roberta Bussamara, Irina Lubeck, Leonardo Broetto, Vanessa Feder, Angela Junges, Juliano T. Boldo, Alessandra Pelegrini, Guilherme Kranz; por estarem ao meu lado em absolutamente todos os momentos, por serem meu porto seguro em Porto Alegre e por sempre me encorajarem a seguir adiante em todas as situações. Essas pessoas realmente fizeram a diferença na minha vida, tanto pessoal quanto profissional, por isso as considero uma família, a família que a vida me deu.

A todos os colegas dos Laboratórios 220, 217 e 222, pela agradável companhia e pelos aprendizados diários, indispensáveis para meu crescimento.

A Dra. Adriana Seixas, pelo ensinamento e pelo auxílio indispensável nos experimentos de atividade enzimática.

Aos colegas do “Proteomic Mass Spectrometry Laboratory”, por todos os momentos de aprendizado, pelo exemplo de profissionalismo e de coleguismo.

Ao Paulo Carvalho, a Juliana Carvalho e ao Claudio Escobedo, por toda a ajuda recebida durante minha estada em San Diego-CA, antes do doutorado-sanduiche. Se não fosse pelo apoio e carinho de vocês, possivelmente eu nem teria voltado.

Aos funcionários da esterilização, em especial ao Sr. Milton, por ser uma pessoa maravilhosa e prestativa.

Aos secretários da Pós-graduação, Silvia e Luciano, pela disponibilidade e atenção que sempre oferecem aos alunos.

Aos demais colegas do PPGBCM, pelo convívio e auxílio nesses quatro anos.

Ao CNPq, pelas bolsas de doutorado e doutorado-sanduiche.

A FINEP pelo apoio financeiro ao projeto GENOPROT, do qual este trabalho faz parte.

A todos que compartilharam esse período de pós-graduação comigo, do mestrado ao doutorado.

*“A vida é uma pedra de amolar:
desgasta-nos ou afia-nos,
conforme o metal de que somos feitos.”*

George Bernard Shaw

Sumário

Lista de Tabelas	XII
Lista de Figuras	XIII
Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades	XV
Resumo	XVII
Abstract	XVIII
1. JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 <i>Cryptococcus gattii</i>	5
2.1.1 <i>Ecologia e Epidemiologia</i>	6
2.1.2 <i>Reprodução</i>	7
2.1.3 <i>Fatores de virulência</i>	9
2.1.3.1 <i>Capsula</i>	10
2.1.3.2 <i>Melanina</i>	12
2.1.3.3 <i>Capacidade de desenvolvimento a 37°C</i>	13
2.1.3.4 <i>Mating type</i>	14
2.1.3.5 <i>Processos enzimáticos</i>	15
2.1.3.6 <i>Fatores de virulência específicos do genótipo hipervirulento de C. gattii.</i>	17
2.1.4 <i>Criptococose e C. gattii</i>	18
2.2 Micronutriente ferro	20
2.2.1 <i>Homeostase de ferro em S. cerevisiae</i>	22
2.2.2 <i>Homeostase de ferro em C. neoformans</i>	25
2.3 Micronutriente cobre	30
2.3.1 <i>Homeostase de cobre em S. cerevisiae</i>	32
2.3.2 <i>Influência do cobre na expressão dos fatores de virulência e conexões entre os micronutrientes ferro e cobre em C. neoformans</i>	35
2.4 Análise Proteômica	38
2.4.1 <i>Eletroforese bidimensional em gel (Two dimensional gel electrophoresis - 2D-GE)</i>	39
2.4.2 <i>Tecnologia de identificação multidimensional de proteínas (Multidimensional Protein Identification Technology - MudPIT)</i>	40
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivos Específicos	43
4. Capítulo I - Proteomic profiling of the influence of iron availability on <i>Cryptococcus gattii</i>	44
Abstract	46
1. Introduction	46
2. Materials and methods	48
2.1. <i>Fungal strain and growth conditions</i>	48
2.2. <i>Preparation of protein extracts</i>	49

2.3. <i>Sample preparation and MudPIT</i>	50
2.4. <i>Interpretation of MS/MS Data Sets</i>	50
2.5. <i>PatternLab for Proteomics analysis</i>	52
2.6. <i>Gene Ontology (GO) annotation and KEGG analysis</i>	53
2.7. <i>Two-dimensional Gel Electrophoresis</i>	53
2.8. <i>In-gel digestion and LC-MS/MS peptide analysis</i>	55
2.9. <i>Peptidase activity assays</i>	55
2.10. <i>Western blot</i>	56
2.11. <i>Reductase activity</i>	56
3. Results	57
3.1. <i>MudPIT identifications</i>	57
3.2. <i>Gene Ontology Analysis</i>	57
3.3. <i>Analysis of the Hypothetical proteins</i>	58
3.4. <i>The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathway Analysis</i>	59
3.5. <i>Analysis of differentially expressed proteins</i>	59
3.6. <i>Validation of differential protein expression analysis</i>	62
3.7. <i>A proteomic and transcriptomic comparison for C. gattii</i>	63
3.8. <i>Two- dimensional analysis and comparison with MudPIT results</i>	64
4. Discussion	66
References	71
Figures and Tables	78
Supporting Information	90
5. Capítulo II - The effect of the alterations of copper levels in the proteome of <i>Cryptococcus gattii</i>	91
Abstract	93
1. Introduction	93
2. Materials and methods	96
2.1. <i>Fungal strain and growth conditions</i>	96
2.2. <i>Growth curve</i>	97
2.3. <i>Preparation of protein extracts</i>	97
2.4. <i>Sample preparation and MudPIT</i>	98
2.5. <i>Interpretation of MS/MS Data Sets</i>	98
2.6. <i>PatternLab for Proteomics analysis</i>	100
2.7. <i>Gene Ontology (GO) annotation</i>	101
2.8. <i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) analysis</i>	101
2.9. <i>Western blot</i>	102
3. Results	102
3.1. <i>Copper deprivation dramatically affects the growth of C. gattii</i>	102
3.2. <i>Global proteomic analysis</i>	103
3.3. <i>Functional classification of the proteins identified</i>	103
3.4. <i>Comparative proteomic analysis</i>	105
3.5. <i>Copper homeostasis in C. gattii</i>	106
4. Discussion	107
References	112

Figures and Tables	117
Supporting Information	125
6. Capítulo III - Visão global das conexões existentes entre ferro e cobre para a manutenção da homeostase em <i>Cryptococcus gattii</i>	126
1. Introdução	127
2. Objetivos	128
3. Material e Métodos	128
3.1 <i>Comparações entre os proteomas de privação de ferro e cobre</i>	128
3.2 <i>Anotação funcional da classificação por Ontologia gênica (GO)</i>	129
3.3 <i>Western blot</i>	129
3.4 <i>Ensaio enzimático</i>	130
4. Resultados	131
4.1 <i>Análise global do proteome de <i>C. gattii</i> sob limitação de ferro e cobre</i>	131
4.2 <i>Análise da expressão diferencial das proteínas comuns entre LIM e LCM</i>	131
4.3 <i>Validação da análise de expressão diferencial</i>	133
4.4 <i>Possível mecanismo de controle da homeostase de ferro e cobre demonstrado por <i>C. gattii</i></i>	133
5. Discussão	134
6. Conclusão	138
Referências	138
Figuras e Tabelas	141
Material Suplementar	147
7. DISCUSSÃO	148
8. CONCLUSÕES	154
9. PERSPECTIVAS	156
10. REFERÊNCIAS	157

Lista de Tabelas

Capítulo I

Table 1. Putative classification of <i>C. gattii</i> hypothetical proteins.....	85
Table 2. Upregulated proteins after growth of <i>C. gattii</i> in LIM, in comparison to cultivation of the fungus in LIM+Fe. Proteins listed in this table were found to be statistically differentially expressed ($p < 0.01$) and have an absolute fold change greater than 2.5. The set of proteins also satisfies the BH-FDR of 0.05 criterion.....	86
Table 3. Upregulated proteins after growth of <i>C. gattii</i> in LIM+Fe, in comparison to cultivation of the fungus in LIM. Proteins listed here were found to be statistically differentially expressed ($p < 0.01$) and have an absolute fold change greater than 2.5. The set of proteins also satisfies the BH-FDR of 0.05 criterion.....	87
Table 4. Spots from two-dimensional gels (2D-GE) identified by LC-MS/MS.....	88

Capítulo II

Table 1. Comparative analysis of proteins after growth of <i>C. gattii</i> in LCM, in comparison to cultivation of the fungus in LCM+Cu. Proteins listed in this table were found to be statistically differentially expressed ($p < 0.01$) and have an absolute fold change greater than 2.5. The set of proteins also satisfies the BH-FDR of 0.05 criterion.....	122
Table 2. Proteins identified in this study and previously described as part of copper or iron homeostasis in other models.....	124

Capítulo III

Tabela 1. Proteínas com expressão aumentada em células de <i>C. gattii</i> cultivadas em LIM, em comparação com células provenientes de LCM. As proteínas listadas na tabela abaixo se apresentaram diferencialmente expressas estatisticamente ($p < 0.01$), com uma diferença de expressão absoluta, maior que 2,5.....	144
Tabela 2. Proteínas com expressão aumentada em células de <i>C. gattii</i> cultivadas em LCM, em comparação com células provenientes de LIM. As proteínas listadas na tabela abaixo se apresentaram diferencialmente expressas estatisticamente ($p < 0.01$), com uma diferença de expressão absoluta, maior que 2,5.....	145

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo reprodutivo de <i>C. gattii</i>	9
Figura 2. Cápsula polissacarídica de <i>C. gattii</i>	12
Figura 3. Produção de melanina por <i>C. gattii</i>	13
Figura 4. Criptococose.....	19
Figura 5. Ilustração das proteínas envolvidas na homeostase de ferro em <i>S. cerevisiae</i>	23
Figura 6. Proteínas envolvidas na homeostase de ferro em <i>C. neoformans</i>	27
Figura 7. Homeostase de cobre em <i>S. cerevisiae</i>	33
Figura 8: Esquema representativo do funcionamento da técnica de MudPIT.....	42

Capítulo I

Fig. 1. Distribution of proteins of <i>C. gattii</i> obtained after growth of the fungus in LIM and LIM+Fe.....	78
Fig. 2. Gene ontology annotation.....	79
Fig. 3. Peptidase activity of cytoplasmic extracts of <i>C. gattii</i> grown in LIM or LIM+Fe against two different fluorogenic substrates.....	80
Fig. 4. GAPDH expression under iron deprivation or availability to <i>C. gattii</i> cells, determined by western blotting. β -tubulin antibody was used as control of assay.....	81
Fig. 5. Two-dimensional gels from <i>C. gattii</i> grown in iron-depleted (A) and iron replete conditions (B).....	82
Fig. 6. Comparison of functional proteomic profiles obtained using MudPIT and 2D-GE techniques.....	83
Fig. 7. Schematic representation of iron homeostasis in <i>C. gattii</i>	84

Capítulo II

Fig. 1. Growth curve of <i>C. gattii</i> cells grown during 24h in copper depleted (LCM), copper replete (LCM+Cu), iron depleted (LIM) and in a rich medium (YPD).....	117
Fig. 2. GO annotation.....	118
Fig. 3. GAPDH expression under copper deprivation or availability to <i>C. gattii</i> cells determined by <i>western blotting</i>	119
Fig. 4. Interactions of upregulated proteins from comparative proteomic analysis.....	120
Fig. 5. Overview of the main components involved in the copper homeostasis in <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. neoformans</i> serotype A and <i>C. gattii</i>	121

Capítulo III

Figura 1. Distribuição e sobreposição das proteínas identificadas após o crescimento de <i>C. gattii</i> sob privação de cobre (A) e privação de ferro (B).....	141
Figura 2. Avaliação da expressão da proteína GAPDH em extratos protéicos de <i>C. gattii</i> cultivado sob limitação de ferro ou cobre.....	142
Figura 3. Atividade total de proteases (A) e atividade específica de metaloproteases (B) dos extratos de <i>C. gattii</i> cultivado em LIM, LCM e em um meio controle contendo ambos os metais.....	143

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades

2D-GE	Eletroforese bidimensional em gel
2D-LC-MS/MS	Cromatografia líquida bidimensional acoplada a espectrometria de massas em tandem
ACN	Acetonitrila
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Da	Dalton
DB	<i>Database</i>
DTT	Ditiotreitol
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
GO	<i>Gene ontology</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
IEF	Isoeletrofocalização
kDa	Kilodalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LCM	<i>Low copper medium</i>
LIM	<i>Low iron medium</i>
MCA	Metilcumarina
MS	<i>Mass spectra</i>
MudPIT	<i>Multidimensional Protein Identification Technology</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pH	Potencial de hidrogênio iônico
pI	Ponto isoelétrico
PMSF	Fenilmetilsulfonilflúor
PTMs	Modificações pós-traducionais
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
Q	<i>Quadrupole</i>
RP	<i>Reverse phase</i>
SCX	<i>Strong cation exchange</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódio

TOF	<i>Time of flight</i>
TPCK	Tosil fenilalanil clorometil cetona
V	Volts
<i>xg</i>	Força centrífuga

Resumo

Os micronutrientes ferro e cobre possuem uma ampla distribuição na natureza e são utilizados por quase todos os organismos vivos. Em se tratando de patógenos, os mecanismos utilizados para a manutenção da homeostase desses metais possuem ligação com a expressão dos fatores de virulência e, por consequência, auxiliam no estabelecimento do patógeno no hospedeiro e início da doença. *Cryptococcus gattii* é uma levedura encapsulada, que causa criptococose em indivíduos imunocompetentes e em animais. Essa espécie é responsável por um surto de criptococose nas ilhas Vancouver, Canadá, com altos índices de mortalidade e morbidade registrados do ano de 1999 até o presente. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo o esclarecimento dos papéis envolvendo a homeostase de ferro e cobre no patógeno *C. gattii*. Para isto, foi realizada uma análise proteômica global e comparativa em células de *C. gattii* cultivadas sob presença/limitação de ferro e/ou cobre. Essa análise foi feita utilizando a metodologia de identificação multidimensional de proteínas (MudPIT), associada ou não com géis bidimensionais (2D-GE). Nossos resultados demonstraram que o fungo *C. gattii* sofre alterações metabólicas, principalmente envolvendo funções mitocondriais, na ausência dos micronutrientes ferro ou cobre. As análises também mostraram que o fungo responde a privação desses micronutrientes por um aumento na atividade de proteases, o que poderia vir a ser uma regulação pós-traducional utilizada por esse patógeno para manter a homeostase desses metais. Adicionalmente, funções específicas desempenhadas pelo fungo na ausência de ferro ou cobre também foram identificadas.

Abstract

Iron and copper have a ubiquitous distribution in living organisms; the competition for such between the host and pathogen is related with disease establishment. *Cryptococcus gattii* is an encapsulated yeast that causes cryptococcosis in immunocompetent individuals and animals. This pathogen is responsible for an ongoing outbreak in Vancouver Island, Canada, which has substantial mortality and morbidity rates. In this context, the aim of this work was to clarify the mechanisms involved in the maintenance of iron and copper homeostasis in *C. gattii*. To accomplish that, a global and comparative proteomic analyses were performed in *C. gattii* cells grown in replete/depleted iron and/or copper conditions. For these analysis was used the multidimensional protein identification technology (MudPIT) associated, or not, with two-dimensional gels (2D-GE). Our results demonstrated metabolic alterations in response to iron and copper deprivation in *C. gattii*, mainly associated with mitochondrial functions. The results also showed a high protease activity in cells of *C. gattii* grown in iron and copper deprivation in comparison with control. This might be a posttranslational regulation developed by *C. gattii* to maintain metal homeostasis. In addition, specific functions related to iron and to copper control were identified.

1. JUSTIFICATIVA

Cryptococcus gattii é um dos agentes etiológicos da criptococose em humanos e animais. A criptococose é uma doença sistêmica, a qual inicia por inalação de propágulos do fungo pelo hospedeiro. Os propágulos alojam-se nos pulmões, e neste ambiente o fungo pode ser eficientemente fagocitado e destruído pela célula de defesa imune, ou sobreviver e se multiplicar no interior de macrófagos (Del Poeta 2004; Alvarez & Casadevall 2006; Ma *et al.* 2006; Alvarez & Casadevall 2007). Após o estabelecimento da doença pulmonar, o fungo dissemina, via hematogênica, atingindo o sistema nervoso central e ocasionando quadros de meningoencefalite ou meningite (Chayakulkeeree & Perfect 2006; Ma & May 2009).

C. gattii possui fatores de virulência bem estabelecidos, dos quais se pode destacar a presença de uma cápsula polissacarídica, a produção do pigmento melanina e a capacidade de sobreviver e proliferar à temperatura fisiológica do hospedeiro (Ma & May 2009). Estudos realizados em *Cryptococcus neoformans*, outro agente etiológico da criptococose, apresentaram conexões entre a expressão desses fatores de virulência e a presença ou ausência de micronutrientes, tais como ferro e/ou cobre (Barluzzi *et al.* 2002; Lian *et al.* 2005; Jung *et al.* 2006; Tangen *et al.* 2007; Waterman *et al.* 2007; Jung & Kronstad 2008; Jiang *et al.* 2009a; Jiang *et al.* 2009b; Jung *et al.* 2009; Chun & Madhani 2010; Jung *et al.* 2010).

O ferro é um metal que atua como cofator ou grupo prostético para enzimas essenciais, as quais são envolvidas em diversas funções celulares e papéis metabólicos (Schaible & Kaufmann 2004; Dunn *et al.* 2007). Esse elemento possui um importante papel na virulência de muitos patógenos. A disponibilidade de ferro

no ambiente hospedeiro é extremamente baixa e os patógenos necessitam desse micronutriente para proliferarem e estabelecerem uma infecção (Schaible & Kaufmann 2004). Por essa razão, os patógenos desenvolveram mecanismos específicos para captação e utilização de ferro durante a invasão no hospedeiro e desenvolvimento da doença. Por consequência, esses mecanismos de captação e utilização desse micronutriente estão diretamente envolvidos na virulência do patógeno. A influência do ferro na virulência e patogenicidade está bastante elucidada em alguns patógenos, como *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *C. neoformans*, entre outros (Andrews *et al.* 2003; Schaible & Kaufmann 2004; Koster 2005; Jung & Kronstad 2008; Sutak *et al.* 2008; Almeida *et al.* 2009b).

O cobre é um elemento traço que desempenha um papel vital como cofactor catalítico para uma ampla variedade de metaloenzimas. Os níveis desse metal são extremamente controlados nos organismos, devido à sua alta toxicidade celular (Rae *et al.* 1999; Banci *et al.* 2010b). No fungo modelo *Saccharomyces cerevisiae*, papéis relacionados a absorção, transporte e homeostase intracelular de cobre vem sendo elucidados (Gross *et al.* 2000; Portnoy *et al.* 2001; Horn & Barrientos 2008; Sharma *et al.* 2010). Em *C. neoformans*, o cobre age como estimulador da expressão da enzima lacase, responsável pela produção de melanina e, na formação da cápsula polissacarídica, as quais são fatores de virulência da espécie (Zhu *et al.* 2003; Jiang *et al.* 2009a; Jiang *et al.* 2009b; Chun & Madhani 2010).

C. gattii tornou-se um importante foco de estudo, após o início de um surto de criptococose em 1999 nas ilhas Vancouver, parte da Colúmbia Britânica, no Canadá (Kidd *et al.* 2004; Byrnes & Heitman 2009; Datta *et al.* 2009; Galanis & Macdougall 2010). Esse surto foi causado por linhagens pertencentes a dois sub-genótipos do

genótipo VGII/AFLP6, de *C. gattii*, VGIIa e VGIIb (Kidd *et al.* 2004; Ngamskulrunroj *et al.* 2010). O genótipo VGIIa é predominante e hipervirulento, enquanto VGIIb é hipovirulento e menos encontrado (Kidd *et al.* 2004). Alguns estudos vêm sendo conduzidos para se descobrir mecanismos específicos que tornam o genótipo VGIIa mais virulento quando comparado ao VGIIb e as outras linhagens de *C. gattii*. Até o momento, sabe-se que linhagens do genótipo VGIIa possuem maior habilidade de se desenvolverem e produzirem melanina a 37°C e ainda, possuem uma cápsula polissacarídica com menor diâmetro (Ngamskulrunroj *et al.* 2010). Embora essas alterações nos clássicos fatores de virulência de *C. gattii* possam justificar a hipervirulência de linhagens VGIIa, Ma e colaboradores (2009), aprofundaram esse conhecimento. Linhagens VGIIa também possuem uma alteração na regulação mitocondrial, ocasionando um aumento na taxa de proliferação e sobrevivência no interior dos macrófagos, contribuindo para sua hipervirulência (Ma & May 2010). Essa descoberta mostra a importância dos estudos dos mecanismos moleculares de hipervirulência das linhagens VGIIa, para elucidação e controle dessa espécie emergente.

Para *C. gattii*, até o momento não há descrições na literatura sobre a influência da alteração de níveis dos micronutrientes ferro e/ou cobre em sua fisiologia e virulência. Neste contexto, o presente trabalho visa contribuir para o esclarecimento dessa influência na linhagem R265, proveniente do surto de criptococose nas ilhas Vancouver, pertencente ao genótipo VGIIa de *C. gattii*. Para essa investigação, foi utilizada a técnica de identificação multidimensional de proteínas (MudPIT), visando uma descrição proteômica global e comparativa. Adicionalmente, géis bidimensionais (2-DE) foram realizados sob as mesmas

condições empregadas para o MudPIT, e seus resultados auxiliaram na confirmação e complementação dos dados obtidos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Cryptococcus gattii*

C. gattii é uma levedura basidiomicética pertencente ao complexo de espécies *Cryptococcus neoformans*, que compreende as espécies *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. neoformans* var. *grubii* e *C. gattii* (Lin & Heitman 2006). Essas leveduras são agentes etiológicos da criptococose, uma doença que atinge humanos e animais. *C. neoformans* é cosmopolita, geralmente isolado de excreta de pombos, ou outras aves e, é a causa mais comum de criptococose em indivíduos imunosuprimidos (Casadevall & Perfect 1998). Em contraste, *C. gattii* habita preferencialmente árvores de diversas espécies em regiões de clima tropical, subtropical e mais recentemente, em locais de clima temperado (Kidd *et al.* 2004; Campbell *et al.* 2005; Abegg *et al.* 2006; MacDougall & Fyfe 2006; Kidd *et al.* 2007; Mak *et al.* 2010). *C. gattii* é considerado um patógeno primário, infectando principalmente indivíduos imunocompetentes, porém há relatos, em menor escala, de imunocomprometidos infectados, na maioria dos casos pacientes HIV-positivos (Muyembe Tamfum *et al.* 1992; Bodasing *et al.* 2004). *C. neoformans* é a espécie modelo do complexo, sendo amplamente estudada e elucidada. Porém, um surto de criptococose causado pela espécie *C. gattii* nas ilhas Vancouver, no Canadá, tem demonstrado a importância do conhecimento dos mecanismos específicos dessa espécie emergente. As espécies do complexo possuem alguns fatores de virulência em comum, mas também possuem diferenças fenotípicas, genotípicas e epidemiológicas marcantes (Sorrell 2001; Katsu *et al.* 2004; Kwon-Chung & Varma

2006). Portanto, sendo *C. gattii* o modelo de estudo do presente trabalho, estão revisadas abaixo as características já estudadas e consideradas específicas dessa espécie, bem como as características comuns entre as espécies do complexo.

2.1.1 Ecologia e Epidemiologia

C. gattii era tradicionalmente descrito por habitar regiões de clima tropical e subtropical, porém, atualmente assume-se sua presença em áreas de clima temperado (Kwon-Chung & Bennett 1984; Kidd *et al.* 2004; Kidd *et al.* 2007; Mak *et al.* 2010). Inicialmente, foi isolado somente em árvores do gênero *Eucalyptus*, sendo esse nicho determinado como preferencial (Ellis & Pfeiffer 1990; Pfeiffer & Ellis 1992; Sorrell *et al.* 1996), mas tem sido encontrado em árvores de diversas espécies, e estudos recentes têm demonstrado que o solo pode ser de fato seu reservatório principal (Chen *et al.* 1997; Kidd *et al.* 2007). Há ainda alguns relatos de isolamentos, em menor escala de *C. gattii* de excretas de aves (Sorrell 2001; Abegg *et al.* 2006; Springer & Chaturvedi 2010).

C. gattii é dividido em dois sorotipos, B e C, baseado nas características antigênicas presentes em sua cápsula polissacarídica (Sorrell 2001). Estudos epidemiológicos moleculares, baseados em análises por PCR *fingerprinting* e por Polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado (AFLP), classificaram a espécie *C. gattii* em quatro tipos moleculares distintos, VGI=AFLP4, VGII=AFLP6, VGIII=AFLP5 e VGIV=AFLP7 (Boekhout *et al.* 2001; Meyer *et al.* 2003; Meyer *et al.* 2009). Esses genótipos possuem distribuição geográfica e grau de virulência distintos. Por exemplo, o genótipo VGI, é considerado endêmico na Austrália e seu isolamento é descrito em diversas regiões geográficas (Chen *et al.* 2000; Ellis *et al.*

2000; Meyer *et al.* 2003). Já o genótipo VGII é responsável por aproximadamente 95% das infecções causadas no surto de criptococose no Canadá e nos Estados Unidos e também foi isolado no Brasil (Chen *et al.* 2000; Kidd *et al.* 2004; MacDougall *et al.* 2007; Byrnes *et al.* 2010). Os genótipos VGIII e VGIV são encontrados com menor frequência, sendo o tipo VGIII isolado em regiões Iberoamericanas e na Índia, e o tipo VGIV contendo registros na África do Sul e nos Estados Unidos (Chen *et al.* 2000; Ellis *et al.* 2000; Meyer *et al.* 2003).

2.1.2 Reprodução

C. gattii é uma levedura geralmente haplóide que predominantemente se reproduz assexuadamente, por brotamento. Porém, ela possui uma fase sexual por sistema de *mating*, com dois *mating types* (MAT), MAT α e MAT α [Figura 1] (Kwon-Chung 1976). O locus MAT no genoma regula o ciclo sexual do fungo e, é diferente entre as células de oposto *mating type* (Kwon-Chung 1976). O *mating* envolve a fusão de células de *mating type* opostos que, estimuladas pela limitação de nutrientes liberam feromônios e quando se encontram sofrem fusão produzindo filamentos dicarióticos (Fraser *et al.* 2003; Idnurm *et al.* 2005). Na formação do basídio, os núcleos se fusionam e ocorre a meiose, formando quatro produtos meióticos, os quais passam por mitose e brotam na superfície do basídio, formando basidiósporos de diferentes *mating type* para serem dispersos no ambiente (Idnurm *et al.* 2005). Investigações acerca do sistema de *mating* em *C. neoformans* e também em *C. gattii*, têm demonstrado uma significativa frequência de isolados MAT α , se comparado ao MAT α , o que dificultaria a reprodução por *mating* no ambiente (Wickes *et al.* 1996; Fraser *et al.* 2005). Baseado nisso, Wickes e

colaboradores (1996) demonstraram que *C. neoformans*, na ausência de um parceiro de *mating type* oposto, passa por um evento de frutificação monocariótica, com a consequente produção de basidiósporos de mesmo *mating type* [Figura 1]. Essa habilidade também foi comprovada em *C. gattii*, nos isolados provenientes do surto nas ilhas Vancouver (Fraser *et al.* 2005).

Ambos os *mating type* de *C. gattii* já foram encontrados em diversas regiões, porém a maior frequência é de isolados apresentando MAT α (Campbell & Carter 2006). Sabe-se que o evento de frutificação monocariótica ocorre principalmente em isolados desse *mating type*. Isso explicaria a alta frequência de linhagens contendo MAT α , se comparado com os isolados MAT α , tanto para *C. neoformans* como para *C. gattii* (Wickes *et al.* 1996; Fraser *et al.* 2005; Idnurm *et al.* 2005).

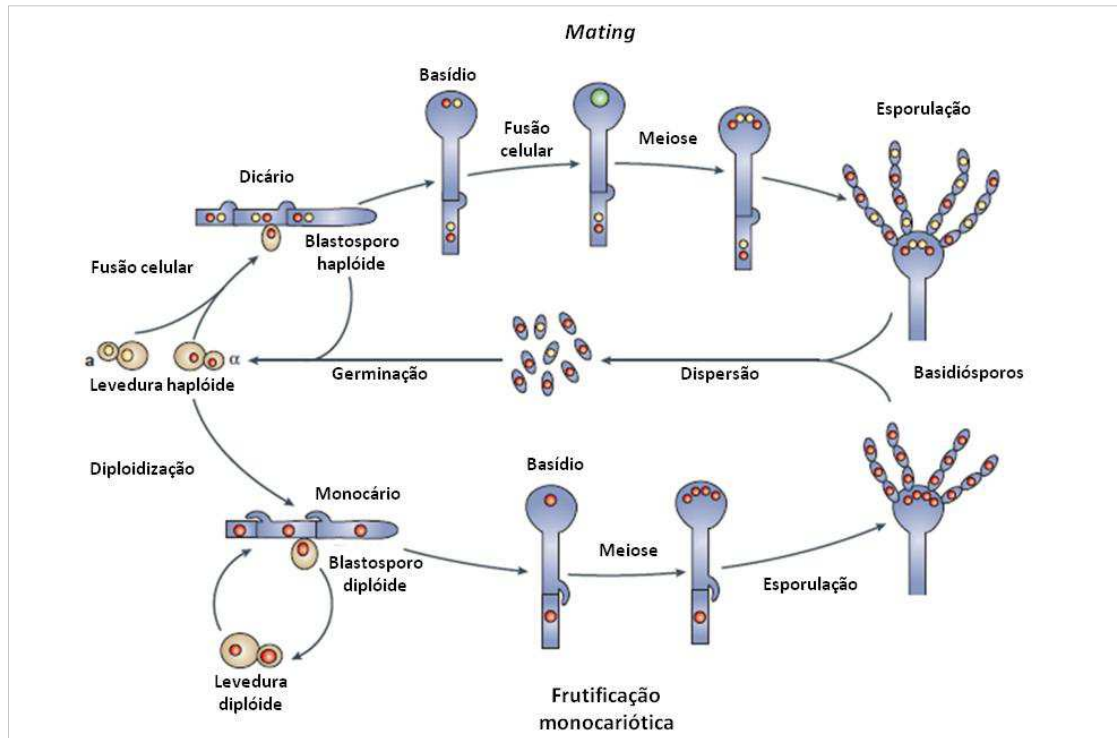


Figura 1. Ciclo reprodutivo de *C. gattii*. A reprodução sexual por *mating* ocorre a partir da fusão de duas células de *mating type* opostos, MATa e MATα. Após a fusão, ocorre a formação de uma hifa dicariótica, que passa por um processo de divisão celular (meiose), resultando na produção de basidiósporos de ambos os *mating type*. Na frutificação monocariótica, células do mesmo *mating type* (geralmente MATα), sofrem diploidização formando uma hifa monocariótica diplóide. Esta, por sua vez, sofre meiose, produzindo basidiósporos de mesmo *mating type*. Ambos os processos liberam basidiósporos para o ambiente, os quais em condições favoráveis germinam, dando origem às células leveduriformes. Figura adaptada de Idnurm *et al.*, 2005.

2.1.3 Fatores de virulência

As espécies do complexo *Cryptococcus* possuem determinantes de virulência bem elucidados, dentre os quais se destaca a presença de uma cápsula polissacarídica, a habilidade de produzir melanina, a capacidade de sobreviver e proliferar-se a 37⁰C, dentre outros. Porém, para a espécie *C. gattii*, existem ainda mecanismos moleculares que foram descritos recentemente, os quais se acredita

serem únicos do genótipo hipervirulento de *C. gattii* proveniente das ilhas Vancouver. Esses fatores presentes nas espécies do complexo *Cryptococcus* e específicos de *C. gattii* estão descritos em detalhe abaixo.

2.1.3.1 Cápsula. A cápsula é um importante fator de virulência das espécies do complexo *Cryptococcus* composta basicamente de 90 a 95% de glicuronoxilomanana (GXM), 5% de galactoxilomanana (GalXM) e aproximadamente 1% de manoproteínas (McFadden *et al.* 2007; Rakesh *et al.* 2008). A molécula de GXM é um polímero, que confere as características antigênicas das espécies do complexo, possibilitando a diferenciação dos sorotipos das mesmas (James & Cherniak 1992; Cherniak & Sundstrom 1994). A GalXM é um polímero de menor massa se comparado a GXM, espalhada por toda a extensão da cápsula (McFadden *et al.* 2006). Sabe-se que GXM e GalXM dividem propriedades imunomodulatórias (Zaragoza *et al.* 2009). Estudos recentes acerca da molécula de GXM em *C. neoformans* e *C. gattii* demonstraram características distintas dessa molécula entre as espécies e os sorotipos avaliados (Fonseca *et al.* 2010). Por exemplo, a GXM oriunda de *C. gattii* sorotipo B apresentou o menor diâmetro dentre as linhagens analisadas no estudo e também uma particular reatividade sorológica (Fonseca *et al.*, 2010). As manoproteínas, quando manosiladas e glicosiladas, agem como antígenos criptocócicos, os quais estimulam respostas de células T por promover a maturação e ativação de células dendríticas (Mansour *et al.* 2002; Levitz & Specht 2006; Specht *et al.* 2007).

Análises no genoma de *C. neoformans* demonstraram a presença de mais de 30 genes que provavelmente estejam envolvidos na formação da cápsula (Loftus *et*

al. 2005). Alguns genes já foram testados e assumidos como essenciais para a síntese da cápsula, tais como: *CAP59*, *CAP64*, *CAP60* e *CAP10* (Chang & Kwon-Chung 1994; Chang *et al.* 1996; Chang & Kwon-Chung 1998, 1999). Outros genes foram descritos por estarem envolvidos diretamente ou indiretamente na formação da cápsula polissacarídica, tais como o *CAS1*, *CAS3*, *UXS1*, *UGD1*, *MAN1*, *GMT1*, *CMT1*, *CAC1*, *PKA1*, *NRG1*, *PDE1*, *CIR1*, *CAN2*, *CAS31*, *CAS32*, *CAS33*, *CAS34*, *CAS35*, dentre outros (Bar-Peled *et al.* 2001; D'Souza *et al.* 2001; Janbon *et al.* 2001; Wills *et al.* 2001; Alspaugh *et al.* 2002; Griffith *et al.* 2004; Moyrand & Janbon 2004; Hicks *et al.* 2005; Lian *et al.* 2005; Cramer *et al.* 2006; Mogensen *et al.* 2006; Cottrell *et al.* 2007).

No ambiente, a cápsula desempenha um papel de proteção ao fungo contra a desidratação e apresenta espessura fina (Aksenov *et al.* 1973). Já no hospedeiro, promove a evasão do sistema imune e consequente sobrevivência do patógeno (Vecchiarelli *et al.* 2003; Alvarez & Casadevall 2006). Durante a infecção, ocorre um alargamento da cápsula (Guimarães *et al.* 2010; Chrisman *et al.* 2011) e, *in vitro* ela pode ser induzida por altas concentrações de CO₂ (Granger *et al.* 1985; Bahn *et al.* 2005), limitação de ferro (Vartivarian *et al.* 1993; Lian *et al.* 2005; Jung *et al.* 2006) e por soro (Zaragoza *et al.* 2003). A cápsula polissacarídica pode ser visualizada em microscópio óptico, a partir da técnica de coloração negativa, a qual está evidenciada na figura 2.

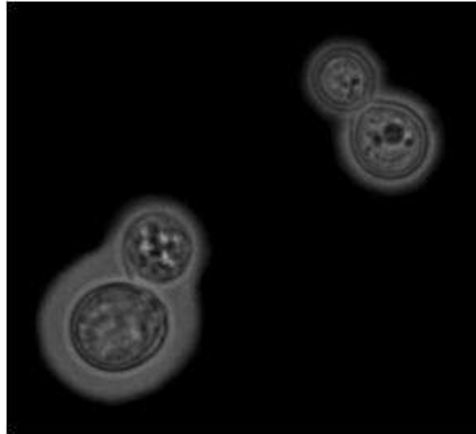


Figura 2. Cápsula polissacarídica de *C. gattii*. O fungo possui uma cápsula polissacarídica que o protege, no ambiente, contra desidratação. Durante uma infecção, a cápsula atua como um importante fator de virulência, protegendo o fungo do ataque do sistema imune hospedeiro. Figura elaborada por Juliana Crestani.

2.1.3.2 Melanina. A capacidade de produção de melanina por *C. neoformans* e *C. gattii* é considerada outro importante fator de virulência dessas espécies (Figura 3). A melanina é sintetizada pela enzima lacase, e essa síntese ocorre quando compostos fenólicos estão presentes, como por exemplo, catecolaminas presentes no sistema nervoso central (Williamson *et al.* 1998). Nas espécies do complexo *Cryptococcus*, a melanina é sintetizada durante a infecção, protegendo o fungo contra danos oxidativos (Wang *et al.* 1995) e contra a ação de algumas drogas antifúngicas, como por exemplo, caspofungina e anfotericina B (van Duin *et al.* 2002). No ambiente, a melanina protege o fungo contra luz ultravioleta, altas temperaturas e congelamento (Wang & Casadevall 1994).

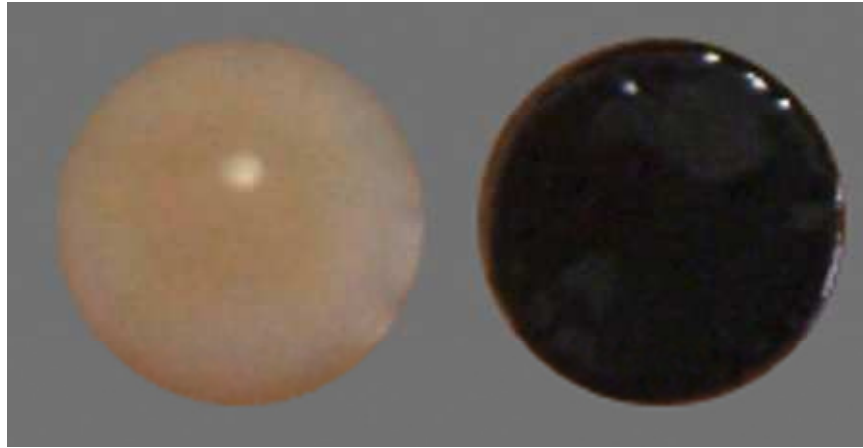


Figura 3. Produção de melanina por *C. gattii*. Colônias de *C. gattii*, sorotipo B, produtoras (coloração marrom) e não produtoras (coloração bege) de melanina. Figura adaptada de Ma & May, 2009.

Estudos moleculares da síntese de melanina, identificaram dois genes essenciais para sua biosíntese, o gene *LAC1* e o *LAC2* (Zhu & Williamson 2004; Missall *et al.* 2005). Outros genes essenciais têm sido descritos, tais como *VPH1*, *CLC1*, *CCC2* e *ATX1*, embora na maioria dos casos o mecanismo de ação não esteja totalmente elucidado (Erickson *et al.* 2001; Zhu & Williamson 2003; Walton *et al.* 2005).

2.1.3.3 Capacidade de desenvolvimento a 37°C. As espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são capazes de se desenvolverem normalmente a 37°C, temperatura fisiológica de hospedeiros mamíferos (Perfect 2005). Embora ambas as espécies desenvolvem-se normalmente a temperatura do hospedeiro, estudos comparativos demonstraram que *C. gattii* e *C. neoformans* var. *neoformans* são mais sensíveis para crescimento a altas temperaturas, se comparados a *C. neoformans* var. *grubii* (Martinez *et al.* 2001). Estudos têm sido realizados na espécie *C. neoformans* no sentido de identificar genes necessários para tolerância a 37°C e genes regulados

por temperatura (Steen *et al.* 2002; Perfect 2005; Rosa e Silva *et al.* 2008). Um dos primeiros genes implicado no desenvolvimento de *C. neoformans* a 37⁰C foi o gene *CNA1*, o qual codifica para a calcineurina A de *C. neoformans* (Odom *et al.* 1997). A partir desse estudo, um papel na capacidade de crescimento a elevadas temperaturas por cascatas de sinalização foi proposto e outros genes envolvidos em rotas de sinalização foram implicados no crescimento de *C. neoformans* a altas temperaturas, tais como *RAS1*, *RAS2*, *CNB1*, *MPK1* e *CTS1* (Odom *et al.* 1997; Alspaugh *et al.* 2000; Waugh *et al.* 2002; Fox *et al.* 2003; Kraus *et al.* 2003). Outros estudos identificaram genes envolvidos na regulação transcricional da resposta a alteração de temperatura, como por exemplo, os genes *AOX1* e o *COX1* (Akhter *et al.* 2003; Toffaletti *et al.* 2003). Ainda outros genes envolvidos no crescimento de *C. neoformans* em alta temperatura foram identificados (*VPH1*, *CCN1*, *ILV2*, *SPE3/LYS9*, *MGA2*, entre outros). Esses estudos demonstraram que em *C. neoformans*, os genes cuja expressão é regulada pela temperatura em que o fungo se encontra, não estão por regra envolvidos no crescimento do fungo a altas temperaturas e, que os genes implicados na habilidade do fungo crescer em altas temperaturas não são obrigatoriamente regulados pela temperatura (Perfect 2005).

2.1.3.4 Mating type. O *mating type* é descrito como um fator de virulência para a espécie *C. neoformans*. Essa afirmação foi iniciada a partir de um estudo epidemiológico, o qual demonstrou a prevalência de isolados de *C. neoformans* MAT α no ambiente e na maioria das amostras clínicas mundiais (Kwon-Chung & Bennett 1978; Casadevall & Perfect 1998). Outra evidência que o *mating type* é um fator de virulência, foi dada utilizando isolados de ambos os *mating type* de *C. neoformans*, sorotipo D em um modelo murino de criptococose, o qual demonstrou

que os isolados MAT α foram mais virulentos que os MAT α (Kwon-Chung *et al.* 1992). Porém, outro estudo utilizando linhagens de *C. neoformans*, sorotipo A, demonstraram que ambos os *mating types* dessa linhagem tiveram equivalente virulência em modelos animais (Nielsen *et al.* 2003). Para *C. gattii*, acredita-se que o *mating type* esteja envolvido na virulência, visto que a maioria dos isolados do surto de criptococose nas ilhas Vancouver são MAT α , porém até o momento não há estudos específicos para essa espécie (Fraser *et al.* 2003).

Estudos moleculares acerca do *locus* MAT α e MAT α , mostram que ele possui mais do que 100kb de tamanho, tanto para *C. neoformans* como para *C. gattii*. Esse *locus* é composto por mais de 20 genes, alguns com funções relacionadas ao ciclo sexual e, um conjunto de genes que parecem não possuir função específica no evento de *mating* (Lengeler *et al.* 2002; Fraser & Heitman 2004).

2.1.3.5 Processos enzimáticos. Algumas enzimas degradativas produzidas pelas espécies do complexo *Cryptococcus* atuam como fatores que auxiliam na virulência dessas espécies, como por exemplo, proteinases, fosfolipases e ureases.

As proteinases produzidas por *C. neoformans* degradam proteínas hospedeiras, como colágeno, elastina, fibrinogênio, imunoglobulinas e fatores do complemento (Chen *et al.* 1996). Alguns estudos têm sugerido que as proteinases e fosfolipases são produzidas durante a replicação de *C. neoformans* no interior de macrófagos, provendo nutrientes para o patógeno e causando danos ao sistema de defesa do hospedeiro (Chen *et al.* 1996; Tucker & Casadevall 2002).

Assim como as proteases, as fosfolipases atuam degradando o tecido hospedeiro e permitindo a invasão e a proliferação de *C. neoformans*. Esse fungo secreta uma fosfolipase com atividades de fosfolipase B1 (PLB1), lisofosfolipase (LPL) e lisofosfolipase transacilase (LPTA) (Steenbergen & Casadevall 2003). *C. gattii* secreta uma fosfolipase que possui atividade de LPL e LPTA (Wright *et al.* 2004b). Estudos de deleção do gene da fosfolipase B (*cnPLB1*) em *C. neoformans*, levaram à uma reduzida virulência de desse patógeno *in vivo* e inibição do crescimento em uma linhagem de macrófago-like (Cox *et al.* 2001). Além disso, foi demonstrado que as fosfolipases auxiliam na adesão de *C. neoformans* no epitélio pulmonar e promovem a disseminação da criptococose (Santangelo *et al.* 2004; Ganendren *et al.* 2006).

As ureases são enzimas que hidrolisam uréia à amônia e carbamato. Essas enzimas são descritas como fatores de virulência para *C. neoformans* e *C. gattii*, sendo expressas pelo gene *URE1* (Cox *et al.* 2000; Torres-Rodríguez *et al.* 2008). Recentes estudos acerca da função da urease na infecção por *C. neoformans* evidenciaram que, além do mecanismo “cavalo de Tróia”, esse fungo atravessa a barreira hematoencefálica em um processo urease-dependente e sem envolvimento de monócitos (Charlier *et al.* 2009; Shi *et al.* 2010). Isso demonstra a influência direta dessa enzima na disseminação da criptococose para o sistema nervoso central. Alguns estudos demonstraram que a atividade de urease de *C. neoformans* é maior do que a apresentada por *C. gattii* (Kwon-Chung *et al.* 1987; Torres-Rodríguez *et al.* 2008). Porém, mais estudos são necessários para elucidar o papel da urease nas linhagens de *C. gattii*.

2.1.3.6 Fatores de virulência específicos do genótipo hipervirulento de *C. gattii*.

Devido ao surto de criptococose nas ilhas Vancouver, estudos sobre mecanismos específicos do genótipo hipervirulento de *C. gattii* vem sendo realizados. Neste contexto, Ma e colaboradores (2009) evidenciaram um reforçado parasitismo intracelular apresentado pelas linhagens hipervirulentas de *C. gattii* do surto nas ilhas Vancouver, quando comparadas a linhagens de mesmo genótipo, provenientes de outros locais. Investigações acerca desse parasitismo demonstraram que essas linhagens possuem uma alteração na regulação mitocondrial. Esses autores propuseram que, depois de linhagens hipervirulentas de *C. gattii* serem engolfadas por macrófagos, elas são capazes de formar uma mitocôndria de morfologia tubular, a qual mais eficientemente, repararia danos ao DNA mitocondrial causados pelo engolfamento (Ma *et al.* 2009). Porém, ainda não está elucidado se essa atividade de regulação mitocondrial, ou se a mitocôndria em si é importante para a virulência das linhagens hipervirulentas do surto das ilhas Vancouver (Ma *et al.* 2009).

Em um recente estudo transcricional comparativo envolvendo um representante da linhagem hipervirulenta (R265) e um da linhagem hipovirulenta (R272) de *C. gattii* alguns genes, potencialmente responsáveis pela virulência, desta espécie foram caracterizados (Ngamskulrunroj *et al.* 2011). Dentre os genes que apresentaram um aumento da expressão na linhagem R265, comparada com a R272, estão genes que são relacionados aos três maiores fatores de virulência do complexo *Cryptococcus neoformans*: a melanina (*LAC1*, *LAC2* e *ATX1*), a cápsula polissacarídica (*CAS3*) e a capacidade de crescimento a 37°C (*MPK1*). Porém, estudos utilizando linhagens mutantes para esses genes demonstraram que somente o *LAC1* e o *MPK1* influenciaram efetivamente a virulência de *C. gattii* R265. Os autores ainda descrevem que muitos genes da linhagem R265 envolvidos

no metabolismo celular, na divisão celular e receptores de feromônios, apresentaram uma diminuição na expressão quando comparados a R272 (Ngamskulrunroj *et al.* 2011). Isso demonstra que mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos moleculares específicos dessas linhagens hipervirulentas.

2.1.4 Criptococose e *C. gattii*

A criptococose pelas espécies do complexo *Cryptococcus neoformans*, se inicia após a inalação de propágulos infectivos do fungo, sendo estes os basidiósporos da fase sexual, ou leveduras dissecadas, dispersas no ambiente (Chayakulkeeree & Perfect 2006). Esses propágulos chegam aos pulmões e produzem ou não alguma doença, dependendo do estado imunológico do hospedeiro e da espécie infectante (Lin & Heitman 2006) [Figura 4]. Uma vez no pulmão, *C. neoformans* ou *C. gattii* por via hematogênica chegam ao sistema nervoso central, ocasionando meningoencefalites ou meningites, sendo consideradas as formas mais graves da doença (Chayakulkeeree & Perfect 2006). Diferente de *C. neoformans*, a infecção pulmonar causada pela espécie *C. gattii* é agressiva e persiste um longo período antes da disseminação para o sistema nervoso central (Krockenberger *et al.* 2010). Há ainda a formação de lesões nos pulmões infectados por *C. gattii* e nódulos cerebrais (Mitchell *et al.* 1995; Speed & Dunt 1995; Krockenberger *et al.* 2010). Na forma disseminada, observa-se ainda o desenvolvimento de infecções cutâneas na forma de pápulas, pústulas ou ainda nódulos subcutâneos (Weatherhead *et al.* 2006). Há casos raros de infecção

cutânea primária, sem disseminação e ainda de infecções em outros órgãos (Seo *et al.* 2006; Souza *et al.* 2006; Leão *et al.* 2010).

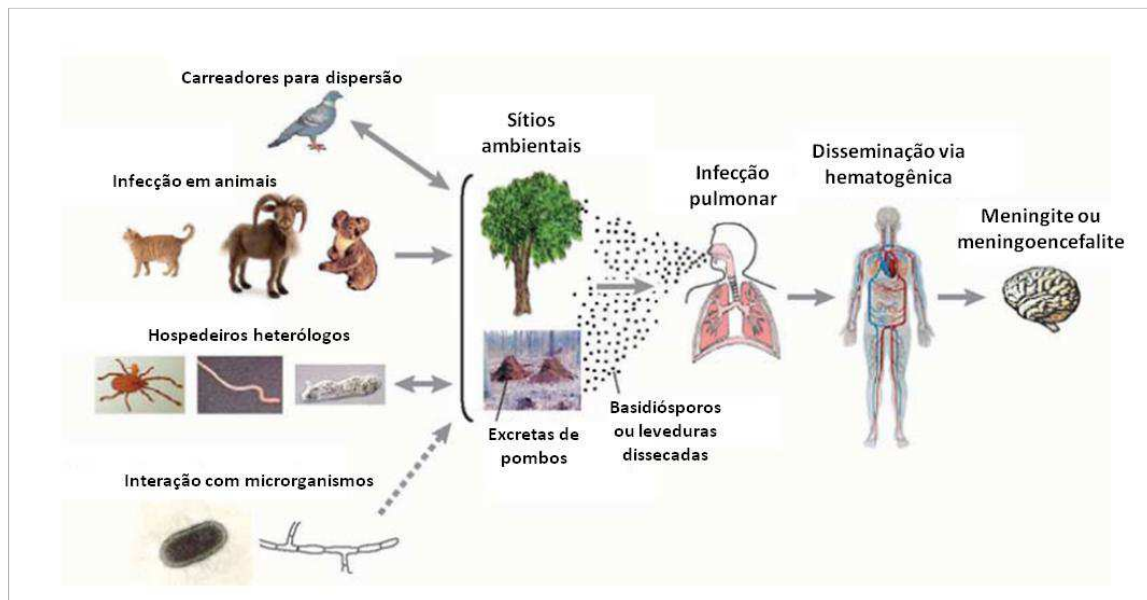


Figura 4. Criptococose. Propágulos infectivos do fungo presentes em sítios ambientais podem se dispersar por carreadores naturais, ou infectar diversos animais, permanecer internalizados em hospedeiros heterólogos ou ainda interagir com outros microrganismos presentes no ambiente. Na infecção humana esses propágulos são inalados e alojam-se inicialmente nos pulmões. Após a disseminação via hematogênica, ocasionam meningite ou meningoencefalites. Figura adaptada de Lin & Heitman, 2006.

Um surto de criptococose iniciou-se no ano de 1999 nas ilhas Vancouver, na Colúmbia Britânica, no Canadá, afetando humanos e animais (Kidd *et al.* 2004; Duncan *et al.* 2005; Duncan *et al.* 2006b; MacDougall *et al.* 2007). Até o final do ano de 2008, mais de 240 casos haviam sido registrados em humanos e 360 casos em animais somente na Colúmbia Britânica (Galanis & Macdougall 2010). Esses dados representam a mais alta incidência de infecção por *C. gattii* já registrada no mundo (Kidd *et al.* 2004; Bartlett *et al.* 2008; Mak *et al.* 2010). Investigações acerca do agente causal desse surto, identificaram a prevalência de dois sub-genótipos do genótipo VGII/AFLP6 de *C. gattii*, VGIIa/AFLP6A e VGIIb/AFLP6B (Kidd *et al.* 2004).

O genótipo VGI, o qual é endêmico em outras regiões, foi isolado em menor frequência (Byrnes *et al.* 2009a). O genótipo VGIIa é majoritário e hipervirulento, já o VGIIb é minoritário e hipovirulento.

Não obstante, no ano de 2004, foi registrado o primeiro caso de criptococose em humanos no estado de Oregon, nos EUA, iniciando um quadro dessa doença pelo Noroeste do Pacífico, o qual foi inicialmente visto como uma disseminação do surto das ilhas Vancouver (Byrnes *et al.* 2009b; Byrnes *et al.* 2010). Registros de 2004 a 2010 somaram um total de 60 casos humanos em 4 diferentes estados americanos (Califórnia, Idaho, Oregon e Washington) e, 52 casos em animais ((CDC) 2010). Porém, estudos epidemiológicos classificaram os isolados americanos como pertencentes aos sub-genótipos VGIIa e VGIIc, sendo VGIIa geneticamente distinto dos isolados das ilhas Vancouver e, VGIIc nunca antes encontrado (MacDougall *et al.* 2007). Essa evidência tem chamado a atenção dos pesquisadores para essas linhagens emergentes de *C. gattii*, visto que elas possuem um alto grau de adaptabilidade e, principalmente porque infectam majoritariamente indivíduos imunocompetentes.

2.2 Micronutriente ferro

O ferro é um micronutriente essencial para células eucarióticas e procarióticas. Esse metal é cofator de uma ampla variedade de enzimas, as quais estão envolvidas em vários processos metabólicos essenciais. O ferro é requerido para a síntese de cofatores orgânicos e inorgânicos, tais como o heme e o cluster ferro/enxofre (Fe/S) (Lill & Muhlenhoff 2008). Também é utilizado na metalação de enzimas mononucleares (Ozer & Bruick 2007). As proteínas que contêm ferro são

empregadas para liberação de oxigênio, para a oxidação de Acetil-CoA através do ciclo do ácido cítrico (TCA) e, para a geração de ATP via fosforilação oxidativa (Shakoury-Elizeh *et al.* 2010). Seus cofatores são necessários para a síntese e o reparo de danos ao DNA, bem como para a biosíntese de aminoácidos, proteínas, esteróis e ácidos graxos (Dunn *et al.* 2007). Também são utilizados para o metabolismo de xenobióticos (Shakoury-Elizeh *et al.* 2010).

Esse metal de transição realiza uma reação de oxidação e redução entre seus dois estados: o férrico (Fe^{+3}) e o ferroso (Fe^{+2}). Em situações de privação de ferro, a célula pode sofrer um atraso no ciclo celular e é levada à morte. Quando há excesso de ferro livre no citoplasma (Fe^{+2}), ele reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) via reação de Fenton, gerando Fe^{+3} e radicais hidroxila (OH^\cdot), os quais resultam em dano oxidativo para membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos (Hentze *et al.* 2004). Por essa razão, sua homeostase é extremamente controlada em nível celular.

Existe uma correlação bem estabelecida entre a aquisição de ferro e a expressão de fatores ligados à virulência de microrganismos patogênicos (Sutak *et al.* 2008). Em células de mamíferos, por exemplo, existe um sistema elaborado para efetivamente reduzir a quantidade de ferro acessível aos patógenos. O ferro é predominantemente intracelular e, a pequena quantidade de ferro extracelular está fortemente ligada a proteínas, tais como transferrina e lactoferrina (Dunn *et al.* 2007). Os patógenos, por essa razão, desenvolveram sistemas para captação, redução para utilização da pequena quantidade de ferro existente nas células do hospedeiro. Esses mecanismos de aquisição de ferro das células do hospedeiro tornaram-se diretamente relacionados à virulência desses microrganismos

patogênicos sendo, em alguns casos, cruciais para o desenvolvimento da doença (Sutak *et al.* 2008).

As bactérias possuem mecanismos bem elucidados sobre a captação e utilização de ferro de seus hospedeiros (Skaar 2010). Em se tratando da homeostase de ferro nos fungos, o modelo de estudos é *S. cerevisiae*. Estudos em fungos patogênicos humanos vêm sendo desenvolvidos em algumas espécies, tais como *C. albicans*, *C. neoformans*, *H. capsulatum*, *Aspergillus fumigatus*, entre outros (Lan *et al.* 2004; Jung *et al.* 2008; Philpott & Protchenko 2008; Sutak *et al.* 2008; Almeida *et al.* 2009a; Kornitzer 2009). Abaixo estão revisados os principais mecanismos para aquisição e utilização de ferro no fungo modelo *S. cerevisiae* e no patógeno *C. neoformans*.

2.2.1 Homeostase de ferro em *S. cerevisiae*

S. cerevisiae possui um sistema de alta afinidade para adquirir ferro do ambiente em que se encontra o que pode ser feito por dois mecanismos distintos, um sistema redutor e um não redutor (Philpott & Protchenko 2008). O sistema redutor utiliza redutases férricas (Fre1-4) extracelulares que reduzem Fe^{+3} a Fe^{+2} , que é absorvido por uma permease (Ftr1) em conjunto com uma multicobre ferroxidase de superfície celular (Fet3) (Askwith *et al.* 1994; Stearman *et al.* 1996). A ferroxidase é originada em um compartimento do trans-Golgi e é dependente da atividade de um transportador de cobre intracelular (Ccc2) e de uma chaperona de cobre (Atx1) (Yuan *et al.* 1995). No sistema não-redutor, complexos de ferro ligados a sideróforos (Fe^{+3} -sideróforos) são reconhecidos por 4 distintos transportadores (Arn1p, Arn2p/Taf1p, Arn3p/Sit1p e Arn4p/Enb1p), os quais reconhecem distintas

classes de sideróforos e reduzem essas moléculas de ferro intracelularmente (Philpott *et al.* 2002; Philpott 2006) [Figura 5]. Não há evidência que o fungo *S. cerevisiae* produza sideróforos, porém sabe-se que ele utiliza sideróforos produzidos e liberados no ambiente por outros microrganismos (Philpott *et al.* 2002).

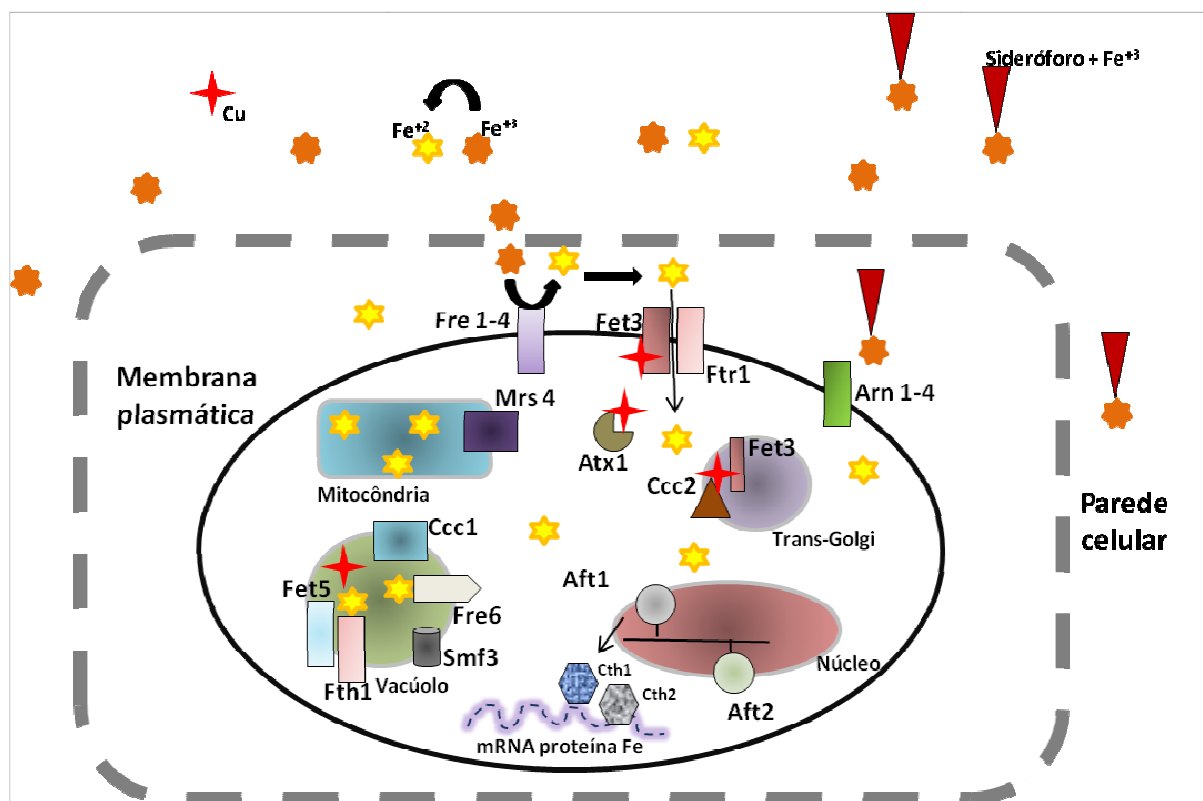


Figura 5. Ilustração das proteínas envolvidas na homeostase de ferro em *S. cerevisiae*. Redutases (Fre1-4) fazem a redução de Fe^{+3} para Fe^{+2} , o qual é absorvido por um sistema de alta afinidade (Fet3/Ftr1). O mesmo pode ser transportado e armazenado no vacúolo (Ccc1), encaminhado e utilizado na mitocôndria (Mrs4), ou enviado para o núcleo. No núcleo há um complexo regulador transcricional (Aft1/Aft2), o qual responde à alteração nos níveis de ferro intracelular ou extracelular. Uma regulação a nível pós-transcricional também ocorre, com proteínas degradadoras de RNA mensageiro (Cth1/Cth2). Figura elaborada por Juliana Crestani.

Em condições de privação de ferro, *S. cerevisiae* responde com regulação em nível transcricional e/ou pós-transcricional, auxiliado pelos fatores de transcrição Aft1p e Aft2p (Philpott & Protchenko 2008) [Figura 5]. Aft1p ativa a transcrição de

uma série de genes envolvidos na aquisição de ferro do ambiente, na mobilização de ferro estocado, e nas alterações metabólicas que ocorrem durante o desenvolvimento da levedura durante a privação de ferro (Yamaguchi-Iwai *et al.* 1995). Aft2p, embora menos estudado, também influencia a transcrição da maioria dos genes regulados e alguns não regulados por Aft1p (Blaiseau *et al.* 2001; Rutherford *et al.* 2003; Courel *et al.* 2005). Esses fatores de transcrição, por exemplo, sob baixos níveis de ferro intracelular, ativam a transcrição de Cth1 e Cth2, as quais são proteínas ligantes a RNA que especificamente reconhecem regiões 3' não-traduzida (3'-UTR) de muitos transcritos que codificam proteínas que necessitam de ferro como cofator, promovendo a degradação desses transcritos (Puig *et al.* 2008) [Figura 5]. Na regulação pós-transcricional, *S. cerevisiae* ativa a expressão de proteínas que levam a degradação de mRNAs que codificam proteínas com funções dependentes de ferro (Puig *et al.* 2008).

S. cerevisiae possui ainda, um sistema de estoque de ferro intracelular, que possibilita seu desenvolvimento por várias gerações em ambientes limitados desse micronutriente. Estudos tem demonstrado que o vacúolo é o principal compartimento para estoque de ferro nesse fungo (Raguzzi *et al.* 1988; Singh *et al.* 2007). Quando há ferro extracelular em abundância, um transportador de ferro e manganês (Ccc1p) atua para que ocorra o acúmulo de ferro no vacúolo (Chen & Kaplan 2000). Em caso de privação de ferro, a transcrição de Ccc1p é diminuída e o regulador Aft1p ativa a expressão de proteínas que fazem o efluxo do ferro acumulado no vacúolo, para ser utilizado pela célula (Philpott & Protchenko 2008). Uma dessas proteínas é a Fre6p que, juntamente com a Smf3p está envolvida na redução e remoção de ferro e cobre no vacúolo (Singh *et al.* 2007). O vacúolo de *S. cerevisiae* possui um sistema de alta afinidade por Fe^{+2} , similar ao existente na

membrana plasmática, composto pelas proteínas Fet5p e Fth1p (Urbanowski & Piper 1999) [Figura 5]. Embora o vacúolo seja o principal reservatório de ferro, substanciais quantidades de ferro estão presentes na mitocôndria, onde átomos desse metal são incorporadas no heme e no cluster Fe/S (Protchenko & Philpott 2003).

Como citado acima, o metabolismo de *S. cerevisiae* também é afetado pela falta de ferro. Recentemente Shakoury-Elizeh e colaboradores (2010), demonstraram os efeitos da falência de ferro no fluxo de metabólitos em *S. cerevisiae*. Através de uma análise metabolômica, os autores relataram que a utilização de fontes de carbono e a biosíntese de lipídios são afetadas pela deficiência desse metal (Shakoury-Elizeh *et al.* 2010). Foram observadas alterações no fluxo de metabólitos através dos papéis da biossíntese de ergosterol e de esfingolipídeos, onde o heme e enzimas dependentes de ferro atuam. Embora algumas enzimas dependentes de ferro sejam resistentes a períodos de privação desse micronutriente, outras exibem a perda de seus cofatores e funções (Shakoury-Elizeh *et al.* 2010). Essas análises demonstram a importância da homeostase do ferro nos processos celulares normais da levedura modelo *S. cerevisiae*.

2.2.2 Homeostase de ferro em *C. neoformans*

O ferro desempenha uma função relevante na patogenicidade de *C. neoformans*. Estudos tem demonstrado que esse micronutriente influencia na expressão de pelo menos dois dos principais fatores de virulência desse fungo, a cápsula polissacarídica e a melanina (Lian *et al.* 2005; Jung *et al.* 2006). Sabe-se

que altas concentrações desse metal exacerbam a infecção cerebral por *C. neoformans* em camundongos, com uma maior concentração fúngica nos órgãos e maior mortalidade, quando comparado ao controle (Barluzzi *et al.* 2002). Achados recentes da atuação do ferro em *C. neoformans* demonstraram que o fator de transcrição responsivo a ferro, Cir1, exerce uma influência no desenvolvimento sexual desse fungo (Jung & Kronstad 2010). Abaixo estão apresentados os mecanismos elucidados, até o momento, que são utilizados pelo fungo *C. neoformans* para manter a homeostase de ferro na célula (Figura 6).

C. neoformans reduz Fe^{+3} para Fe^{+2} através de reductases férricas (Fre) presentes na superfície celular, também por redutores exportados (incluindo o ácido 3-hidroxiantranílico – 3HAA) e ainda pela melanina (Nyhus *et al.* 1997). Embora não seja clara a importância das reductases de superfície celular na virulência de *C. neoformans*, sabe-se que elas fazem a maior contribuição, *in vitro*, na redução de Fe^{+3} para Fe^{+2} (Jung & Kronstad 2008). A molécula 3HAA é um redutor secretado pelo fungo e sabe-se que ele é responsável por reduzir 50% do Fe^{+3} extracelular, portanto acredita-se que existam outros redutores que são secretados pelo fungo (Nyhus *et al.* 1997). A melanina está presente na parede celular e, além de atuar na patogenicidade da levedura, também auxilia na redução férrica (Nyhus *et al.* 1997). Tem sido sugerido, que a enzima lacase, responsável pela produção de melanina, possa desempenhar um papel na infecção aproveitando o ferro do ambiente hospedeiro. Ela possui uma forte atividade de oxidase de Fe^{+2} , o que poderia proteger as células fúngicas do ataque oxidativo de macrófagos e, ainda contribuir para o transporte de ferro (Garcia-Rivera *et al.* 2005).

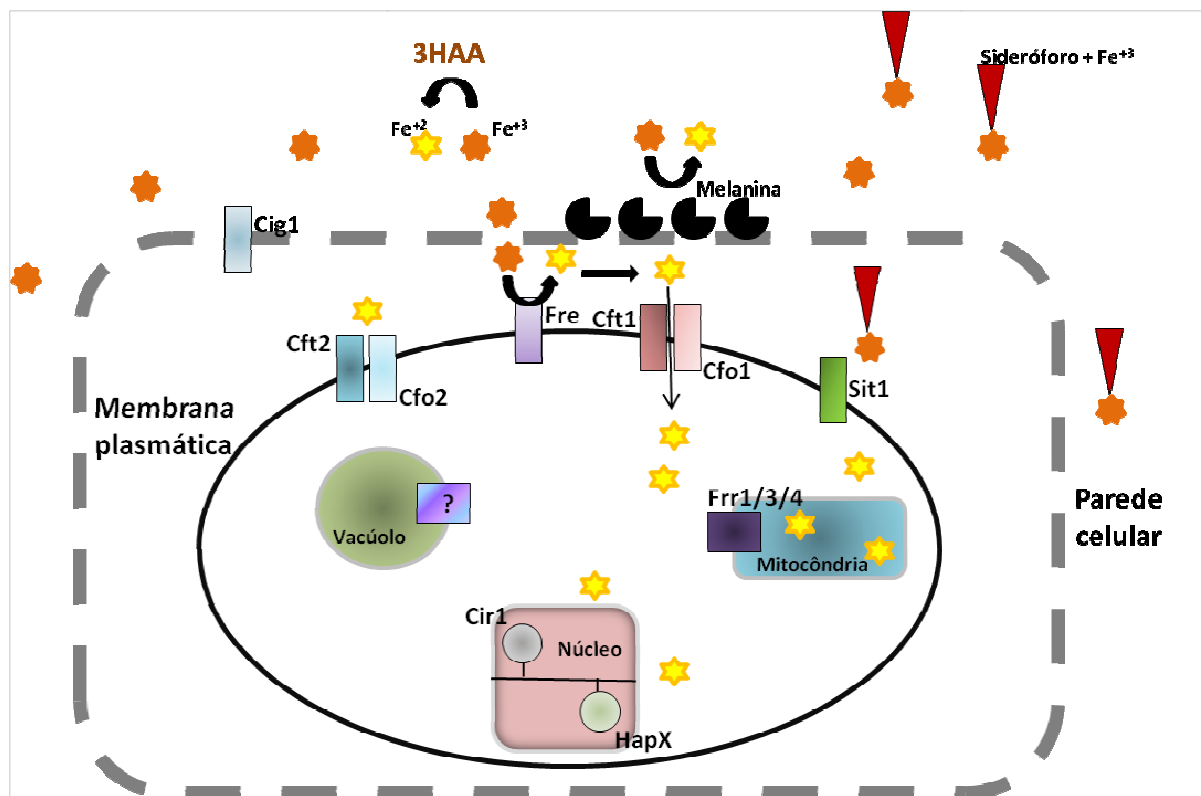


Figura 6. Proteínas envolvidas na homeostase de ferro em *C. neoformans*. O fungo reduz Fe^{+3} para Fe^{+2} por 3 principais sistemas: reductases de superfície celular (Fre), redutores extracelulares (3HAA) e melanina. Após a redução, o Fe^{+2} é transportado para o interior celular, por um complexo de alta afinidade contendo uma permease (Cft1) e uma ferroxidase (Cfo1). O transportador de sideróforos Sit1, a proteína Cig1 e as proteínas mitocondriais Frr1/3/4 desempenham um papel na absorção e homeostase de ferro. Os reguladores transcricionais, Cir1 e HapX, controlam os papéis relacionados a ferro e ainda os papéis envolvidos na virulência de *C. neoformans*. Figura adaptada de Jung & Kronstad, 2008.

Após a redução, o metal é absorvido por um complexo de alta afinidade composto por uma permease (Cft1) e por uma ferroxidase (Cfo1) [Figura 6]. A alta afinidade do complexo é dependente da eficiência da redução de Fe^{+3} pelas reductases de superfície e/ou pelos redutores exportados e sua atividade é dependente de cobre (Jacobson *et al.* 1998). Outro par de genes codificando para uma permease (Cft2) e uma ferroxidase (Cfo2) está presente em *C. neoformans*, porém suas funções são distintas (Jung *et al.* 2008; Jung *et al.* 2009) [Figura 6]. A permease Cft1 é essencial para absorção de Fe^{+2} , para aquisição de ferro ligado a transferrina e para completa virulência em modelo murino de criptococose (Jung *et*

al. 2008). Cft2 por sua vez, exerce uma influência na virulência de *C. neoformans*, mas sua função exata permanece desconhecida (Jung *et al.* 2008). No caso das ferroxidases Cfo1 e Cfo2, a Cfo1 é necessária para utilização de ferro inorgânico, para transferrina e, para completa virulência (Jung *et al.* 2009). A ferroxidase Cfo2, semelhante a permease Cft2, não possui um papel totalmente definido, porém foi demonstrado que ela é dispensável para a patogenicidade do fungo (Jung *et al.* 2009).

C. neoformans não sintetiza sideróforos, mas ele utiliza o ferro ligado a sideróforos secretados por outros microrganismos (Jacobson & Petro 1987; Haas 2003). O gene *SIT1* codifica um transportador de sideróforo, ferroxamina B (Tangen *et al.* 2007) [Figura 6]. Estudos comprovaram que esse gene não influencia na patogenicidade do fungo, sugerindo que o transporte de sideróforos por Sit1 não é relevante na invasão ao tecido hospedeiro (Tangen *et al.* 2007).

Estudos da regulação em nível transcricional de funções relacionados ao micronutriente ferro em *C. neoformans* têm sido realizados. Esse fungo possui um fator de transcrição do tipo GATA, denominado Cir1, que atua diretamente na expressão de alguns dos principais fatores de virulência de *C. neoformans* (cápsula, melanina e crescimento a 37⁰C), bem como nas funções necessárias para a absorção e homeostase de ferro nesse organismo (Jung *et al.* 2006) [Figura 6]. Recentemente, foi demonstrada a influência desse regulador transcricional no desenvolvimento sexual do fungo (Jung & Kronstad 2010). Cir1 é essencial para a virulência de *C. neoformans*, o que foi evidenciando em modelo murino de criptococose (Jung *et al.* 2006). Além do fator Cir1, outros fatores de transcrição com potencial influência na regulação de ferro em *C. neoformans*, incluem o fator responsivo a pH *RIM101* (O'Meara *et al.* 2010), um ortólogo ao fator de transcrição

HAPX e, os componentes do complexo ligante a CCAAT, *HAP3* e *HAP5*, que interagem com HapX em outros fungos (Jung *et al.* 2010) [Figura 6]. Foi evidenciado que HapX e Cir1 dividem algumas funções relacionadas a ferro e também possuem distintas funções. Sob condições de privação ou presença de ferro, HapX regula positivamente os níveis de transcritos de *CIR1*, porém, Cir1 exerce pouca influência nos níveis de transcritos de *HAPX* (Jung *et al.* 2010). Alguns outros fatores de transcrição, que regulam especificamente genes relacionados a funções de captação de ferro, tais como o Tup1, o Nrg1 e o Sre1, também estão descritos (Cramer *et al.* 2006; Chang *et al.* 2007; Lee *et al.* 2009). Interações envolvendo esses fatores na regulação de papéis relacionados a ferro em *C. neoformans* foram demonstradas, as quais enfatizam a complexidade desses mecanismos e ressaltam a importância desse micronutriente para essa espécie patogênica (Jung *et al.* 2006; Jung *et al.* 2010; O'Meara *et al.* 2010; Silva *et al.* 2011).

Em uma recente análise comparativa dos genes envolvidos na homeostase de micronutrientes (ferro, cobre e zinco) de *C. neoformans*, *C. gattii* e *Paracoccidioides brasiliensis*, foram apontadas semelhanças e diferenças entre *C. neoformans* e *C. gattii* (Silva *et al.* 2011). Por exemplo, comparando com os genomas de *S. cerevisiae* e *C. albicans*, *C. neoformans* possui 4 sequências homólogas codificando metaloredutases férricas e 3 sequências para ferroxidases, enquanto *C. gattii* possui 3 sequências homólogas de metaloreductases e somente 1 sequência codificadora de uma ferroxidase. Por outro lado, sequências homólogas para genes codificadores de permeases, genes codificadores dos sistemas de alta e baixa afinidade de absorção de ferro e genes envolvidos na captação de sideróforos, foram identificados em ambas as espécies (Silva *et al.* 2011). Esse tipo

de estudo demonstra a importância do conhecimento de dados específicos da homeostase de micronutrientes em *C. gattii*.

2.3 Micronutriente cobre

O cobre é um íon metálico essencial para eucariotos e bactérias, sendo utilizado como cofator catalítico e estrutural para muitos processos bioquímicos (Banci *et al.* 2010b). Esse elemento atua como cofator de uma ampla variedade de metaloenzimas, incluindo a superóxido dismutase (defesa antioxidante) e a citocromo c oxidase (cadeia de transporte de elétrons). Também está envolvido na aquisição e no transporte de ferro, em eventos de transdução de sinal, no transporte e ativação de oxigênio e na geração de ATP via respiração oxidativa. Devido à sua habilidade catalítica, se há excesso de cobre livre na célula, o mesmo reage com o oxigênio gerando espécies reativas de oxigênio, vindo a causar danos a ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (Laloti *et al.* 2009). Portanto, a homeostase desse metal é cautelosamente controlada e, acredita-se que não exista cobre livre no interior celular (Rae *et al.* 1999), embora quantidades extremamente baixas de cobre livre tem sido confirmadas em células de leveduras (Wegner *et al.* 2010).

Através da doação ou aceitação de um elétron, o cobre pode ser alterado da forma oxidada cúprica (Cu^{+2}) para a forma reduzida cuprosa (Cu^{+}). Em eucariotos, o Cu^{+} entra na célula por duas vias: transportadores de alta afinidade presentes na membrana plasmática ou por permeases de baixa afinidade (Nose *et al.* 2006). No interior celular, o Cu^{+} é ligado a proteínas chamadas de chaperonas de cobre (Pufahl *et al.* 1997), que o transportam à enzimas citosólicas ou a transportadores de membrana que irão liberá-lo no interior de organelas específicas para a utilização

por enzimas dependentes de cobre (Huffman & O'Halloran 2001; Linz & Lutsenko 2007). De uma maneira geral, os eucariotos necessitam que o cobre esteja no meio intracelular, para a maturação das enzimas dependentes desse metal, conforme descrito acima. Em contraste, algumas bactérias utilizam o cobre fora do citoplasma. Por exemplo, as bactérias gram-positivas possuem enzimas dependentes de cobre localizadas na membrana plasmática e que emergem para o espaço extracelular, ou são secretadas (Solioz *et al.* 2010). Já nas gram-negativas, todas as enzimas dependentes de cobre descritas até o momento, encontram-se no periplasma e são solúveis ou incorporadas na membrana interna (Banci *et al.* 2010b). O mesmo ocorre com as cianobactérias, as quais utilizam cobre intracelular.

Semelhante ao micronutriente ferro, o cobre é descrito por atuar, positiva ou negativamente, na virulência de algumas bactérias, fungos e vírus. Em *Mycobacterium tuberculosis*, por exemplo, a resistência ao cobre é essencial para o sucesso da infecção (Wolschendorf *et al.* 2011). Para o fungo patógeno de plantas *Botrytis cinerea*, o cobre é fundamental para sua virulência, visto que mutantes defeituosos na expressão de uma proteína transportadora de cobre (ATPase BcCcc2) foram avirulentos em modelo de infecção de folhas de tomate (Saitoh *et al.* 2010). Já para o patógeno humano *C. neoformans*, o cobre está envolvido na expressão de fatores ligados a virulência dessa espécie, tais como a produção de melanina e a formação da cápsula polissacarídica (Waterman *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2009b; Chun & Madhani 2010). Esses e outros estudos demonstram a importância da elucidação dos papéis relacionados à utilização e homeostase desse micronutriente.

S. cerevisiae possui mecanismos bem caracterizados para a manutenção da homeostase de cobre celular, os quais estão descritos abaixo. Esses papéis são, na maioria, extremamente conservados de leveduras a humanos.

2.3.1 Homeostase de cobre em *S. cerevisiae*

O Cu^{+2} é reduzido a Cu^{+} antes de ser absorvido pela célula por metaloredutases (Fre1 e Fre2) presentes na membrana plasmática (Hassett & Kosman 1995; Van Ho *et al.* 2002) [Figura 7]. *S. cerevisiae* absorve Cu^{+} por dois distintos mecanismos, um sistema de alta afinidade e, um sistema de baixa afinidade. O sistema de alta afinidade é composto por duas permeases, Ctr1 e Ctr3, as quais são dependentes da ação das metaloredutases de superfície (Pena *et al.* 2000; Kim *et al.* 2008) [Figura 7]. Alguns autores demonstraram que a deleção de Ctr1 resultou em defeitos diretos na absorção de cobre e indiretos na absorção de ferro, associado ao fato que a ferroxidase dependente de cobre, Fet3, é essencial para a absorção de ferro (Van Ho *et al.* 2002; Rees & Thiele 2004). A deleção de Ctr1 e Ctr3 em *S. cerevisiae*, levou a uma privação intracelular do micronutriente cobre (Pena *et al.* 1999; Rees & Thiele 2004) e outro membro da família Ctr, o Ctr2, envolvido no estoque de cobre no vacúolo e ainda na importação de cobre da membrana plasmática para dentro da célula, foi identificado (Rees & Thiele 2007). Em situações de privação de cobre, o Ctr2 atua fornecendo cobre do vacúolo para o citoplasma, contribuindo para a homeostase de cobre em *S. cerevisiae* (Rees *et al.* 2004). Duas outras permeases, Fet4 e Smf1, fazem parte do sistema de baixa afinidade de *S. cerevisiae* (Kim *et al.* 2008) [Figura 7].

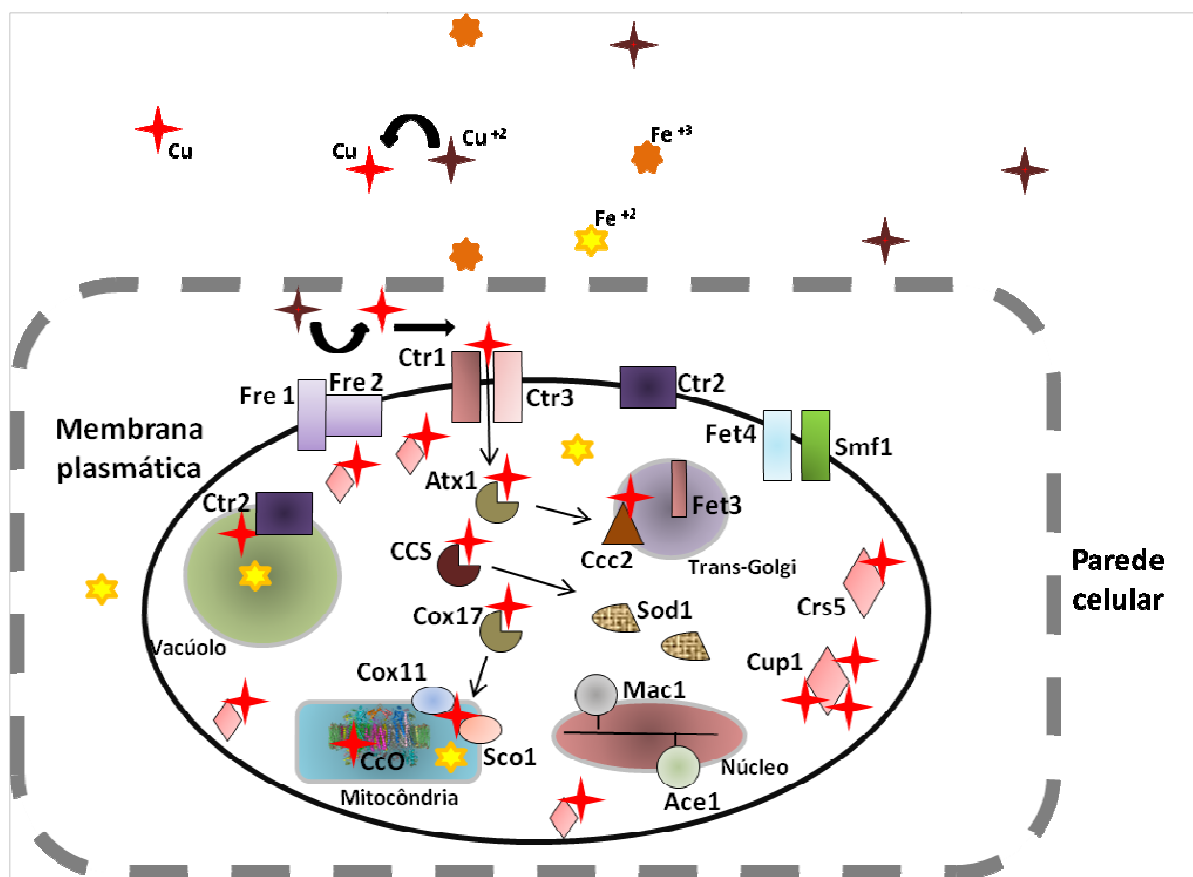


Figura 7. Homeostase de cobre em *S. cerevisiae*. Após a redução de Cu^{+2} para Cu^+ por metaloredutases (Fre1/2), o mesmo é incorporado por permeases de membrana (Ctr1/3 e Fet4/Smf1) e repassado para chaperonas de cobre (Atx1, CCS, Cox17). A nível transcricional, proteínas relacionadas a cobre são rigorosamente controladas por fatores transcricionais (Mac1, Ace1). Metalotioneínas (Crs5, Cup1) capturam moléculas de cobre livre no citoplasma, evitando o efeito tóxico desse metal. Figura elaborada por Juliana Crestani.

Uma vez transferido para o espaço intracelular, o cobre é transportado para compartimentos secretórios, para a mitocôndria ou para enzimas citosólicas, através de chaperonas específicas de cobre. A Atx1 é uma chaperona citosólica que direciona o cobre para o transportador Ccc2 na face trans do complexo de Golgi. A Ccc2, por sua vez, transloca cobre para dentro das vesículas, de onde ele é carregado em um complexo multicobre contendo a proteína ferroxidase Fet3 (Arnesano *et al.* 2001). Outra chaperona envolvida no transporte intracelular é a chaperona de cobre para superóxido dismutase (CCS), que repassa o cobre para a

enzima antioxidante CuZn-superoxido dismutase (SOD1) (Schmidt *et al.* 1999) [Figura 7]. Algumas proteínas estão envolvidas na transferência de cobre para a mitocôndria, para a montagem da citocromo *c* oxidase (CcO). A Cox17 é responsável por liberar o cobre para as proteínas da membrana interna mitocondrial, Cox11 e Sco1, as quais o transferem para a CcO (Horng *et al.* 2004) [Figura 7].

Para manter a homeostase de cobre em condições de excesso desse micronutriente, existem as proteínas denominadas metalotioneínas, as quais são pequenas proteínas ricas em resíduos de cisteínas, encontradas em todos os eucariotos e alguns procariotos (Banci *et al.* 2010b). As metalotioneínas funcionam como moléculas de limpeza de metais pesados, como defensores contra estresse oxidativo e são distribuidores e detoxificadores intracelulares (Palmiter 1998). Em *S. cerevisiae*, duas metalotioneínas são descritas, a Cup1 e a Crs5. Dentre essas, a Cup1 desempenha o papel dominante na neutralização do cobre excessivo celular (Jensen *et al.* 1996) [Figura 7].

A regulação em nível transcricional da homeostase de cobre em *S. cerevisiae* está caracterizada em detalhes, tendo sido identificados dois fatores de transcrição responsivos a cobre. O fator de transcrição Ace1 ativa a expressão gênica em condições de elevados níveis de cobre; já o fator Mac1, ativa a expressão em resposta a deficiência de cobre (Rutherford & Bird 2004) [Figura 7]. Quando *S. cerevisiae* encontra-se em altas concentrações de cobre, Ace1 atua na ativação da expressão dos genes codificadores das metalotioneínas e da SOD1, para proteger a célula contra a toxicidade dos íons cobre (Thiele 1988; Gralla *et al.* 1991; Culotta *et al.* 1994). Em caso de privação de cobre, Mac1 ativa a expressão dos genes responsáveis pela absorção de cobre, *CTR1* e *CTR3*, e da redutase *FRE1* (Labbe *et al.* 1997; Yamaguchi-Iwai *et al.* 1997). Sabe-se também que o fator Mac1 atua na

degradação postraducional de Ctr1, em condições de excesso de cobre (Yonkovich *et al.* 2002).

2.3.2 Influência do cobre na expressão dos fatores de virulência e conexões entre os micronutrientes ferro e cobre em *C. neoformans*

C. neoformans possui um canal de cloreto (Clc-A), descrito por atuar na absorção de cobre em condições de privação desse metal (Zhu *et al.* 2010). Zhu e colaboradores demonstraram ainda que Clc-A está envolvido na atividade da enzima lacase por liberar cobre para o meio interno, o qual atua como um cofator para o funcionamento da enzima (Zhu *et al.* 2010). Proteínas envolvidas na absorção de cobre extracelular durante períodos de homeostasia desse ion, não tem sido descritas.

Proteínas envolvidas no transporte de cobre intracelular, Ctr2 e Ctr4, foram caracterizadas em *C. neoformans* (Waterman *et al.* 2007; Chun & Madhani 2010). Linhagens mutantes para o gene *CTR2*, apresentaram diminuída produção do pigmento melanina quando comparados a linhagem selvagem e, geraram uma cápsula polissacarídica menos proeminente do que a produzida pela linhagem selvagem (Chun & Madhani 2010). Ctr4 é um transportador de cobre ativado pelo fator de transcrição Cuf1. A expressão do gene *CTR4* foi fortemente aumentada nas células fúngicas recuperadas da fagocitose por macrófagos e durante a infecção em cérebros de ratos, porém não em pulmões de ratos infectados (Waterman *et al.* 2007). Os mesmos resultados de expressão de *CTR4* foram observados em infecções provenientes de cérebro de um indivíduo HIV-positivo (Waterman *et al.* 2007). Um homólogo à chaperona de cobre, Atx1 e ao transportador de cobre Ccc2

também foram identificados em *C. neoformans*, os quais foram descritos por estarem envolvidos na biosíntese de melanina nesse fungo (Walton *et al.* 2005; Silva *et al.* 2011). Esses estudos demonstraram a influência da homeostase de cobre na expressão de fatores ligados à virulência de *C. neoformans*.

A resposta à alteração dos níveis de cobre em *C. neoformans* é controlada em parte pelo fator de transcrição Cuf1. O gene *CUF1* divide similaridade de sequência com os fatores de transcrição responsivos a cobre de *S. cerevisiae*, *MAC1* e *ACE1* e com o fator *CUF1* de *Schizosaccharomyces pombe* (Waterman *et al.* 2007). A deleção desse gene em *C. neoformans* causa um forte defeito no crescimento sob condições de privação de cobre e um decréscimo na atividade da enzima lacase (Waterman *et al.* 2007). Porém, a formação da cápsula e a expressão da urease não foram afetadas (Waterman *et al.* 2007). Outro fator de transcrição envolvido na homeostase de cobre é o ativador transcricional OXY2. Foi sugerido que Oxy2 está envolvido na ativação de reductases de ferro/cobre e participa da ativação de transportadores de cobre (Nyhus & Jacobson 2004). Um repressor transcricional global, Tup1, tem sido implicado na regulação da homeostase de ferro e cobre em *C. neoformans*, sorotipo A (Lee *et al.* 2009). Linhagens *tup1Δ* apresentam uma diminuição na expressão de genes ligados a homeostase de ferro (*FTR1*, *SIT2* e *CIG1*) e Cu (*CTR4*) quando comparado à linhagem selvagem H99 (Waterman *et al.* 2007). Os mutantes também se mostraram sensíveis à baixas concentrações dos metais ferro e cobre, comprovando a influência de Tup1 na homeostase desses metais.

Uma série de enzimas dependentes de cobre foram destacadas por estarem envolvidas na virulência do fungo, como é o caso do fator de virulência antioxidante CuZn superóxido dismutase (SOD1) (Narasipura *et al.* 2003). Embora essas

enzimas, juntamente com as proteínas envolvidas na absorção, no transporte e no controle transcricional ao micronutriente cobre tenham sido elucidados, uma lacuna de informações acerca dos mecanismos envolvidos na manutenção da homeostase de cobre em *C. neoformans* permanece em aberto.

Em todos os eucariotos, a limitação de cobre resulta na limitação de ferro. Conexões entre esses micronutrientes podem ser observadas em *C. neoformans*. Por exemplo, a enzima lacase, responsável pela produção de melanina, é uma proteína pertencente a família de multicobre oxidases, que necessitam de cobre para sua ativação. Outro membro da família de multicobre oxidases é a proteína Fet3, uma enzima vital para a absorção de ferro, demonstrando uma interdependência entre cobre e ferro. Em nível transcricional, a regulação envolvendo cobre e ferro também está interligada, como apresentado por estudos no fator de transcrição responsivo a ferro, *CIR1* e, nos fatores de transcrição responsivos a cobre, *CUF1* e *TUP1* (Jung *et al.* 2006; Waterman *et al.* 2007; Lee *et al.* 2009). Linhagens *cir1Δ* de *C. neoformans* apresentaram um aumento de expressão de transcritos para o transportador de cobre *CTR4* sob limitação de ferro (Jung *et al.* 2006). Mutantes do gene *CUF1*, apresentaram uma reduzida disseminação para o cérebro em modelo murino de criptococose, confirmando os resultados obtidos com a linhagem mutante do gene *CFT1* (permease de ferro, do sistema de absorção de alta afinidade) (Waterman *et al.* 2007). Essas evidências sugerem uma função paralela, ou conectada, da necessidade de ferro e cobre para a infecção do sistema nervoso central. O gene *TUP1* apresentou uma diversidade regulatória interessante, atuando na regulação da absorção e da homeostase de ferro e cobre, porém essa regulação foi evidenciada apenas para o sorotipo A de *C. neoformans* (H99) (Lee *et al.* 2009).

2.4 Análise Proteômica

O termo proteoma foi introduzido em 1994 por Marc Wilkins, e é utilizado para definir o conjunto de proteínas produzidas em a partir do material genético disponível. O termo proteômica descreve a habilidade de utilizar ferramentas experimentais para acessar o proteoma, ou proteínas específicas de um organismo, de uma célula ou tecido. A proteômica geralmente utiliza-se de técnicas de separação das proteínas de um complexo, as quais, posteriormente são identificadas por espectrometria de massas. Uma técnica de separação de proteínas amplamente utilizada é a eletroforese bidimensional (2D-GE), a qual tem seu potencial analítico reconhecido desde a sua descrição (O'Farrell 1975). Entretanto, outros métodos de separação de misturas protéicas complexas vem sendo desenvolvidos, tais como a separação por coluna cromatográfica (LC) aprimorando essa etapa da pesquisa proteômica (Motoyama & Yates 2008).

Após a separação de proteínas, a identificação das mesmas é realizada por espectrometria de massas (MS), a qual utiliza a análise de massas para caracterização das proteínas. Para isso, a utilização de diferentes tipos de ionizadores, analisadores de massas, fragmentadores de ions e por conseguinte, programas computacionais de análises de dados são variadamente empregados, visando a obtenção do mais representativo proteoma da amostra analisada (Han *et al.* 2008; Yates *et al.* 2009).

A utilização de técnicas proteômicas na identificação de proteínas envolvidas na interação patógeno-hospedeiro é de grande importância. Com o sequenciamento

do genoma das espécies *C. neoformans* var. *neoformans* (Loftus *et al.* 2005), *C. neoformans* var. *grubii* (*Cryptococcus neoformans* var. *grubii* H99 Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT - <http://www.broadinstitute.org/>) e mais recentemente *C. gattii* (D'Souza *et al.* 2011), torna-se possível o desenvolvimento de trabalhos proteômicos envolvendo esses patógenos.

2.4.1 Eletroforese bidimensional em gel (*Two dimensional gel electrophoresis - 2D-GE*)

Na 2D-GE as proteínas são primeiramente separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI), por isoeletrofocalização (IEF). Neste passo, as proteínas migram em um gradiente de pH, até atingirem seu pI. Posteriormente, uma separação ortogonal em gel de poliacrilamida adicionado de SDS (SDS-PAGE) é realizada, a qual possibilita a separação das proteínas por sua massa (M) (Görg *et al.* 2004). A associação entre MS e 2D-GE tornou possível a identificação das proteínas visualizadas, capacitando estudos proteômicos comparativos, análises de modificações pós-traducionais (PTMs) e identificação de isoformas de proteínas.

Depois de realizada a IEF e posteriormente a segunda dimensão, o gel necessita ser corado para a visualização das proteínas, as quais aparecerão na forma de pequenos pontos, comumente denominados *spots*. Os corantes frequentemente utilizados para coloração de géis 2D são o azul de Comassie e o nitrato de prata, sendo este, o mais sensível. Existem ainda, outras técnicas para detecção de *spots*, tais como o corante SYPRO Ruby e a utilização de corantes fluorescentes (Difference Gel Electrophoresis - DIGE). Essas técnicas, embora

possuam alta sensibilidade de detecção, semelhante ao nitrato de prata, são menos utilizadas devido ao seu alto custo.

Os *spots* podem ser analisados através de programas computacionais de análise de imagens. Esses programas possibilitam a comparação de géis entre réplicas técnicas e biológicas, capacitando a seleção de *spots* com diferentes intensidades, os quais podem conter proteínas com alterada expressão. Após a escolha do *spot* de interesse, o mesmo é excisionado, as proteínas são digeridas no gel e os peptídeos resultantes são removidos para posterior submissão a identificação por MS.

Embora a 2D-GE seja amplamente utilizada, esta técnica possui diversas limitações, tais como a baixa reprodutibilidade; a limitada abrangência da faixa de pH utilizada para a IEF; a sensibilidade do método de visualização das proteínas; a dificuldade na separação de certas proteínas, incluindo as que apresentam-se em baixa abundância, as ácidas, as básicas, as hidrofóbicas, as proteínas muito grandes ou muito pequenas; além de ser uma técnica laboriosa.

2.4.2 Tecnologia de identificação multidimensional de proteínas (Multidimensional Protein Identification Technology - MudPIT)

No MudPIT uma mistura complexa de peptídeos é gerada por clivagem proteolítica e carregada dentro de uma coluna (microcapilar) consistindo de uma resina de troca catiônica forte (SCX) e fase reversa (RP) (Link *et al.* 1999; Washburn *et al.* 2001; Wolters *et al.* 2001) [Figura 8]. Utiliza-se alta pressão para o empacotamento da resina de SCX seguida da resina de RP. Nesta técnica, a

cromatografia de troca iônica, decorre aplicando-se durante a eluição uma “função degrau” de aumento de concentração salina, a qual libera “pacotes de peptídeos” da coluna de troca iônica que ficarão retidos na coluna de fase reversa. A cada “degrau salino”, a coluna RP é submetida a um gradiente hidrofóbico para eluir os peptídeos ao espectrômetro de massas para posteriormente serem identificados por MS/MS (Washburn *et al.* 2001; Wolters *et al.* 2001). A técnica utiliza geralmente, doze degraus de concentração salina produzindo doze corridas cromatográficas LC-MS de RP. O número de degraus de concentração salina podem variar de acordo com a complexidade da amostra analisada.

Os dados gerados são submetidos a algoritmos específicos, tais como o SEQUEST (Eng *et al.* 1994), ou o ProLuCID (<http://fields.scripps.edu/downloads.php>), os quais interpretam os espectros de massas em tandem (MS/MS) gerados e identificam a sequência de peptídeos que melhor descreve o espectro MS/MS do qual ele foi gerado (Eng *et al.* 1994). Os resultados dessa busca são posteriormente processados por filtros estatísticos (ex. DTASelect - (Tabb *et al.* 2002)), os quais determinam as identificações confiáveis e assim, o conteúdo de proteínas da amostra original.

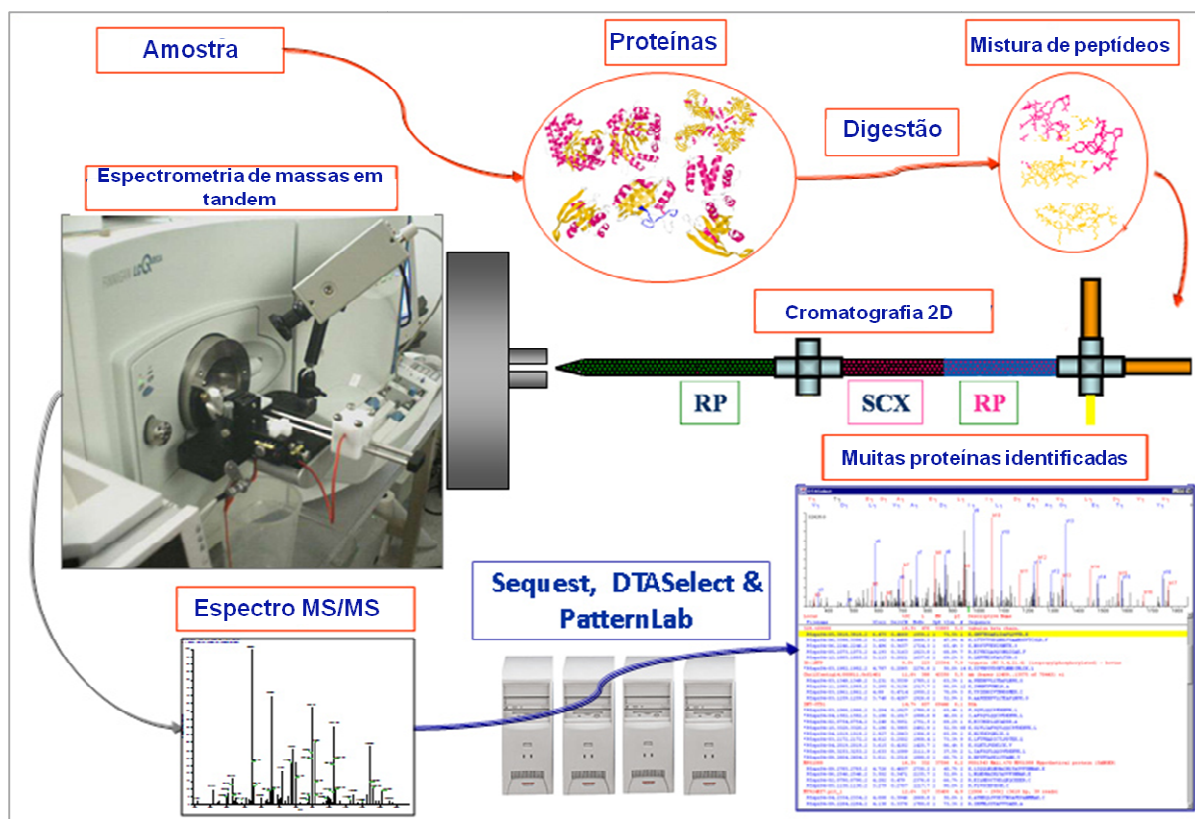


Figura 8: Esquema representativo do funcionamento da técnica de MudPIT. A partir de um complexo de proteínas digeridas, reduzidas e alquiladas, pode-se obter o perfil de peptídeos através do acoplamento de uma coluna cromatográfica, geralmente de fase reversa (RP), a um espectrômetro de massa dotado de uma fonte ionizante do tipo electrospray (ESI). A amostra de proteínas é digerida com uma enzima proteolítica e o complexo de peptídeos gerados é retido na coluna RP e eluído através de um gradiente hidrofóbico para a fonte ionizadora do espectrômetro de massa e pequenas frações da amostra são analisadas por unidade de tempo. Os resultados são comparados ao banco de dados de interesse para a identificação com mesmos, o que é realizado através do programa Sequest, seguido pelo programa DTASelect. As análises posteriores podem ser realizadas com o auxílio do programa PatternLab for Proteomics. (Figura gentilmente cedida pelo Dr. Paulo Costa Carvalho)

A principal vantagem do MudPIT é o poder de separação dos peptídeos. A separação cromatográfica bidimensional permite a técnica obter um intervalo dinâmico de quantificação superior ao da eletroforese bidimensional. Tem sido demonstrado que essa técnica possibilita uma maior detecção de proteínas de baixo peso molecular, as quais são praticamente indetectáveis utilizando 2D-GE, capacitando assim, uma maior representação do proteoma da amostra de interesse (Choe *et al.* 2005).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo principal o esclarecimento dos mecanismos empregados pelo fungo *C. gattii* para manter a homeostase celular dos micronutrientes ferro e cobre. E, por conseguinte, avaliar a influência desses mecanismos nas funções relacionadas à virulência desta espécie.

3.1 Objetivos Específicos

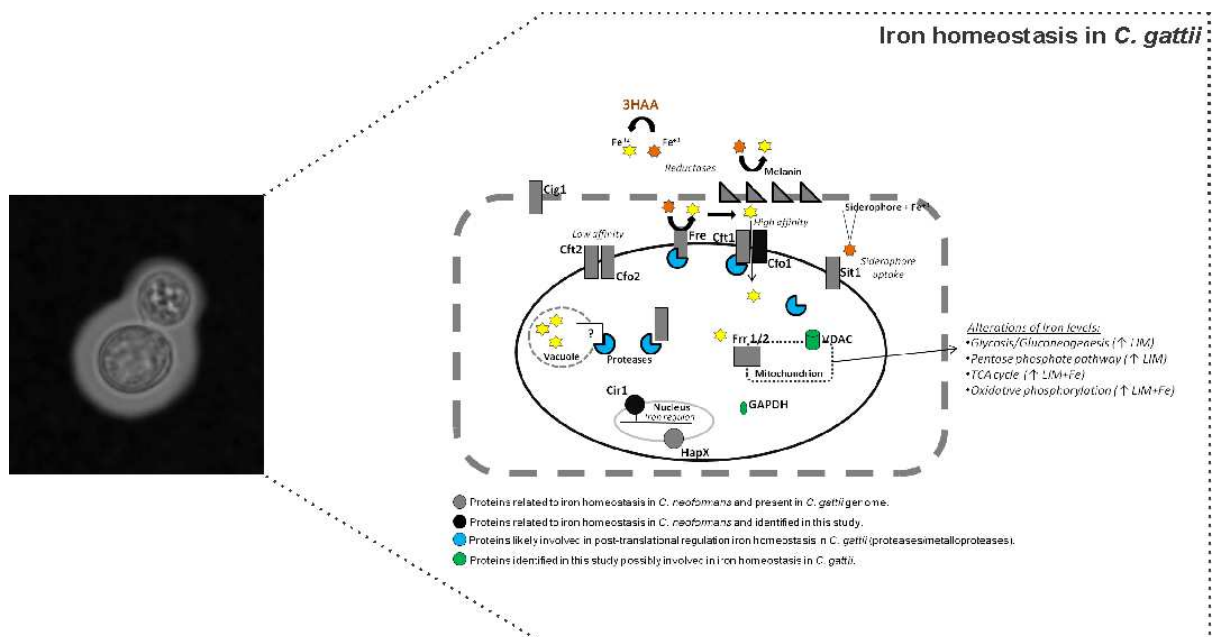
- Caracterizar o perfil proteômico global da linhagem R265 da espécie *C. gattii* sob limitação dos micronutrientes ferro e cobre;
- Analisar as proteínas diferencialmente expressas quanto à influência na fisiologia e homeostasia desses micronutrientes em *C. gattii*;
- Avaliar a influência dos micronutrientes ferro e cobre na expressão dos fatores de virulência do fungo;
- Comparar o perfil proteômico global de *C. gattii* obtido sob privação e sob a condição de homeostase de cada micronutriente, com dados previamente publicados sobre esses metais na espécie *C. neoformans*;
- Avaliar a correlação existente entre as funções desempenhadas por esses micronutrientes em *C. gattii*.

4. Capítulo I:

Artigo submetido à revista “*Journal of Proteome research*” no dia 02 de junho de 2011.

Proteomic profiling of the influence of iron availability on *Cryptococcus gattii*

Synopsis: Iron is an essential micronutrient for such living organisms. *Cryptococcus gattii* is a pathogen that causes cryptococcosis in human and animals. Here, it was evaluated the proteomic response of alteration of iron levels in *C. gattii*. The results obtained in this study will increase the knowledge about iron physiology of this relevant fungal pathogen.



Proteomic profiling of the influence of iron availability on *Cryptococcus gattii*

Juliana Crestani[†], Paulo Costa Carvalho^{‡,§}, Xuemei Han[¥], Adriana Seixas[†],
Leonardo Broetto[†], Juliana de Saldanha da Gama Fischer^{§,£}, Charley Christian
Staats^{†,¥}, Augusto Schrank^{†, ¥}, John R Yates III^{¥,#}, Marilene Henning Vainstein^{*,†, ¥,#}

[†] Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 43421, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brasil;

[‡] Laboratório de Toxinologia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil;

[§] Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde (CDTS), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

[¥] Department of Chemical Physiology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA;

[£] Laboratório de Genômica funcional e Bioinformática, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil;

[¥] Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 43421, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil.

[#] JRY and MHV share senior authorship on this article.

***Corresponding author:** Marilene Henning Vainstein, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 43421, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil. mhv@cbiot.ufrgs.br

ABSTRACT: Iron is essential and ubiquitous in living organisms. The competition for this micronutrient between the host and its pathogens has been related to disease establishment. *Cryptococcus gattii* is an encapsulated yeast that causes cryptococcosis mainly in immunocompetent individuals. In this study, we analyzed the proteomic profile of the *C. gattii* R265 Vancouver Island isolate under iron-depleted and –replete conditions by Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT) and by 2D-GE. Proteins and key mechanisms affected by alteration of iron levels such as capsule production, cAMP-signaling pathway, response to stress, and metabolic pathways related to mitochondrial function were identified. Our results also show both proteomic strategies employed to be complementary.

KEYWORDS: *Cryptococcus gattii* R265, Proteomics, 2D-LC-MS/MS, MudPIT, 2D-GE, iron

1. INTRODUCTION

Cryptococcus gattii is a yeast pathogen that causes cryptococcosis commonly in immunocompetent humans and less frequently in immunosuppressed individuals. (Sorrell 2001; Litvintseva *et al.* 2005; Morgan *et al.* 2006) Cryptococcosis is acquired

by the inhalation of airborne propagules from an environmental source; these invade the lungs and cause a primary pulmonary infection. This pulmonary infection disseminates through the bloodstream and infects the central nervous system causing meningoencephalitis, which is fatal if untreated. (Casadevall & Perfect 1998; Idnurm *et al.* 2005; Chayakulkeeree & Perfect 2006)

C. gattii caused a cryptococcosis outbreak in Vancouver Island, British Columbia, Canada. Genetic studies demonstrated that this outbreak was caused by two distinct genotypes of *C. gattii*, a major hypervirulent genotype VGIIa, and a minor lower virulent genotype VGIIb. (Kidd *et al.* 2004) Substantial morbidity and mortality rates were observed for infections caused by the hypervirulent genotype of *C. gattii*. (Duncan *et al.* 2006a; Nicol *et al.* 2008; Galanis & Macdougall 2010; Lester *et al.* 2011) This scenario has stimulated detailed investigations on this organism. (Ngamskulrunroj *et al.* 2009a; D'Souza *et al.* 2011; Kronstad *et al.* 2011; Ngamskulrunroj *et al.* 2011)

C. gattii and its closely related species *C. neoformans* share virulence determinants, including the production of a polysaccharide capsule, the synthesis of melanin, the production of extracellular enzymes and the ability to grow at 37°C. (Idnurm *et al.* 2005) However, in *C. gattii*, only a few genes such as those for phospholipase B, superoxide dismutase, a transcription factor *STE12α*, and protein kinases, have been studied in connection with pathogenesis. (Latouche *et al.* 2002; Wright *et al.* 2004a; Frealle *et al.* 2005; Narasipura *et al.* 2005; Ren *et al.* 2006; Hicks & Heitman 2007; Ngamskulrunroj *et al.* 2009b) Ma and colleagues (Ma *et al.* 2009) proposed that the VGIIa and VGIIb *C. gattii* genotypes, have an altered mitochondrial function regulation, leading to an increased capacity to survive and proliferate in macrophages and consequently the hypervirulent phenotype.

Mitochondria interfere with important cellular processes including iron metabolism. (Dimmer & Rapaport 2008) The iron metabolism has been described in *C. neoformans*, (Jacobson *et al.* 1998; Lian *et al.* 2005; Jung *et al.* 2006; Jung & Kronstad 2008; Jung *et al.* 2008; Jung & Kronstad 2010; Jung *et al.* 2010) showing important roles in the proliferation of *C. neoformans* and establishment of cryptococcosis. (Barluzzi *et al.* 2002; Jung & Kronstad 2008) For *C. gattii*, however, limited information is available regarding its iron metabolism. (Silva *et al.* 2011)

To access the possible roles of the iron metabolism in the iron regulation of virulence in *C. gattii* we compared the proteomic profile of the representative strain of the major VGIIa genotype of *C. gattii* from the Vancouver outbreak under iron-depleted and replete conditions by using Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT) (Florens *et al.* 2002; Koller *et al.* 2002; Washburn *et al.* 2003; Graumann *et al.* 2004; Wu *et al.* 2004; Carrozza *et al.* 2005; Zybilov *et al.* 2006; Fischer *et al.* 2010) and 2D-GE. Our results identified proteins involved in iron pathways in *C. gattii* that were then compared with the ones from *C. neoformans*. (Lian *et al.* 2005; Tangen *et al.* 2007; Jung *et al.* 2008) In addition, we found both proteomic techniques to be complementary.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Fungal strain and growth conditions

The strain R265 was previously identified by Kidd *et al.* (Kidd *et al.* 2004) and it was a gift from Dr Wieland Meyer from the culture collection of Molecular Mycology

Research Laboratory Westmead Hospital. The strain was grown in 10 ml of Yeast Peptone Dextrose (YPD) broth (yeast extract 1%, peptone 1% and glucose 2%) prior to cultivation in 100 ml of Yeast Nitrogen Base broth (YNB, Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) for 24 h. In order to evaluate the effects of iron on the global protein expression, cells (5×10^7 cells.ml⁻¹) were transferred to 50 ml of Low-Iron medium (LIM, according Jacobson *et al* (Jacobson *et al.* 1998)) and of Iron-replete medium (LIM+Fe, added of 100 μ M FeHEDTA, Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA) for 12 h as described before. (Jacobson *et al.* 1998; Lian *et al.* 2005; Jung *et al.* 2006) All cultures were grown at 37 °C with shaking (200 rpm).

2.2. Preparation of protein extracts

Cells were collected by centrifugation at 7,500 xg for 10 min, lyophilized and then disrupted with mortar and pestle in liquid nitrogen to a fine powder. The samples were suspended in buffer with protease inhibitors (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 50 μ M TPCK, 5 mM Iodoacetamide). Proteins were solubilized by vortexing the suspensions for 5 min, followed by centrifugation at 10,000 g for 20 min. Supernatants were collected and preserved at -20 °C. Remaining cell debris were suspended in the same buffer, followed by vortexing (5 min) and sonication (25 Hz in a VC601 Sonics and Materials Inc. sonicator) in an ice bath for three 30 sec cycles with 1 min intervals. Supernatant was collected after centrifugation, pooled with the first supernatant and stored at -80 °C. Protein concentration was determined using the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA).

2.3. Sample preparation and MudPIT

Approximately 100 μg *C. gattii* protein extracts were suspended in digestion buffer (8 M urea, 100 mM Tris-HCl pH 8.5). Proteins were reduced with 10 mM dithiothreitol at 37 °C for 30 min and alkylated with 15 mM iodoacetamide at room temperature in the dark for 20 min. After addition of 1 mM CaCl_2 (final concentration) the proteins were digested with 2 μg of trypsin (Promega, Madison, USA) by incubation at 37 °C during 16 h. Proteolysis was stopped by adding formic acid to a final concentration of 5%. Samples were centrifuged at 18,000 $\times g$ for 30 min and the supernatant was collected and stored at -20 °C. The conditions used for 2D-LC-MS/MS were as described by Washburn *et al.* (Washburn *et al.* 2001) The flow rate at the tip of the biphasic column was 100 nl /min when the mobile phase composition was 95% H_2O , 5% acetonitrile and 0.1% formic acid. The ion trap mass spectrometer (Finnigan LTQ-XL, Thermo, San Jose, CA) was set to the data-dependent acquisition mode with dynamic exclusion turned on. One MS survey scan was followed by nine MS/MS scans and 12 salt steps were performed. Mass spectrometer scan functions and HPLC solvent gradients were controlled by the Xcalibur data system (Thermo, San Jose, CA). Three biological replicates and two technical replicates were analyzed for both *C. gattii* R265 culture conditions (LIM and LIM+Fe).

2.4. Interpretation of MS/MS Data Sets

Tandem mass spectra were extracted from the raw files using RawExtract 1_9_3 (McDonald *et al.* 2004) and were searched with SEQUEST (Eng *et al.* 1994) against the *C. gattii* R265 strain database plus common contaminant proteins. All

sequences were downloaded as FASTA-formatted files from the Broad Institute protein database, released on August 5, 2009 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans_b/MultiDownloads.html). The peptide mass search tolerance was set to 3 Da. Carboxymethylation was considered as a static modification. No enzymatic cleavage conditions were imposed on the database search, so the search space included all candidate peptides, whose theoretical mass fell within the 3 Da mass tolerance window, regardless of their tryptic status. The validity of peptide/spectrum matches was assessed in DTASelect (Tabb *et al.* 2002) according to the SEQUEST cross-correlation score (XCorr) and the SEQUEST normalized difference in cross-correlation score (DeltaCN). The search results were grouped by charge state (+1, +2 and +3) and tryptic status (Fully tryptic, half-tryptic and non-tryptic), resulting in nine subgroups. In each of the subgroups, the distribution of XCorr and DeltaCN values for the direct and decoy database hits were obtained and the two subsets were separated by quadratic discriminant analysis. Outlier points in the two distributions (for example, matches with very low XCorr but very high DeltaCN) were discarded. As the full separation of the direct and decoy subsets is not generally possible, the discriminant score was set such that a false discovery rate of 1% was determined based on the number of accepted decoy database peptides. This procedure was independently performed on each data subset, resulting in a false-positive rate independent of tryptic status or charge state. In addition, a minimum sequence length of 7 amino acid residues was required, and each protein on the list was supported by at least two peptide identifications. These additional requirements, especially the latter, resulted in the elimination of most decoy database and false-positive hits, as these tended to be overwhelmingly present as proteins identified by

single peptide matches. After this last filtering step, the estimated false discovery rate was reduced to below 1%.

2.5. PatternLab for Proteomics analysis

PatternLab (Carvalho *et al.* 2008; Carvalho *et al.* 2010) was used to pinpoint differentially expressed proteins found in both biological conditions and the ones identified in a single condition. A spectral count database (DB) was firstly obtained by using PatternLab to parse the DTASelect files resulting from the *C. gattii* LIM and *C. gattii* LIM+Fe biological triplicates to the PatternLab's native data format (sparse matrix and index files).

PatternLab's TFold module (Carvalho *et al.* 2009) was used for selecting proteins found in both conditions that were considered as differentially expressed. The spectral counts from each run were normalized according to the Row Sigma normalization. (Carvalho *et al.* 2008) Proteins that were not detected in at least 9 out of the 12 assays (i.e., necessarily detected in both conditions) were not considered in the TFold analysis. Proteins whose average of the spectral counts had an absolute fold change greater than 2.5 and p -value of less than 0.05 according to the t-test were considered as differentially expressed. The fold change cutoff was established by iteratively increasing the cutoff as to have the p -values from all differentially expressed proteins satisfy the BH false discovery estimator criterion of 0.05. (Benjamini & Hochberg 1995)

PatternLab's Approximately Area Proportional Venn Diagram (AAPVD) module (Fischer Jde *et al.* 2010) was used for pinpointing proteins uniquely identified

in a condition. However, we must note that even though a protein was not identified for a condition it could still be present, but under the detection threshold. For the AAPVD analysis, proteins identified in only one of the replicates were discarded.

2.6. Gene Ontology (GO) annotation and KEGG analysis

The Blast2GO tool (<http://www.blast2go.org>) was used to obtain functional categories of proteins. (Conesa *et al.* 2005; Gotz *et al.* 2008) This tool assigns the Gene Ontology (GO) terms based on the BLAST definitions. This was accomplished by submitting the FASTA sequences of the identified proteins to the Blast2GO platform, where they were compared against NCBI databases (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/staff/tao/URLAPI/remote_blastdblist.html). Briefly, Blast2GO used BlastP, using the default parameters, to identify the similar proteins that had GO annotations. The data generated by the Blast2GO analysis were represented at the GO levels 2, 3, and at multilevels, illustrating the general functional categories according biological process and molecular functions. KEGG pathways (Kanehisa & Goto 2000) were assigned based on the GO annotation.

2.7. Two-dimensional Gel Electrophoresis

Lyophilized proteins fractions (ca. 1.2 mg) were submitted to ReadyPrep 2-D Cleanup kit (Bio-Rad, Hercules, CA) according to the manufacturer's recommendations. The final pellet was suspended in 300 μ l of isoelectric focusing buffer (9 M Urea, 4% CHAPS, 1% Dithiothreitol (DTT) and 0.2% Ampholytes pH 3-10 (Bio-Rad, Hercules, CA). The 17 cm immobilized pH gradient strips (pH 4-7, Bio-

Rad, Hercules, USA) were passively rehydrated for 16 h. Isoelectric focusing was performed in a Protean IEF cell system (Bio-Rad, Hercules, USA) with a gradual increase in voltage (250 V for 15 min, followed by 10,000 V until total of 60,000 Vh) with a maximum current setting of 50 μ A per strip at 20 °C. Focused strips were either used immediately or were stored at -80 °C until use. Before executing the second dimension the strips were soaked (15 min) with 10 ml of equilibration buffer (30% glycerol, 6 M Urea, 1% DTT and a trace of Bromophenol blue) followed by incubation (15 min) in a similar solution, except for the replacement of DTT by 4% iodoacetamide. For second dimension vertical SDS-PAGE 12% gels were run using PROTEAN II xi 2D Cell (Bio-Rad, Hercules, USA) at a constant current 50 mA for about 7 h. Proteins were visualized by Coomassie Brilliant Blue G 250 (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA).

Gels were scanned using the Imager Scanner (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and analyzed with the PDQuest 2-D Gel Analysis Software version 8.0.1 (Bio-Rad, Hercules, USA). Selected spots from individual gel images were first matched to at least two other replicate gels. We considered differentially expressed proteins between two experimental conditions (LIM and LIM+Fe) as the ones having $p < 0.01$ according to the Student's t-test. Fold change 2.0 was determined per group. After automatic spot detection, manual editing was performed on all spots to avoid incorrect match detected by the software. Experiments were performed with three biological and technical replicates.

2.8. In-gel digestion and LC-MS/MS peptide analysis

Protein spots were excised from replicate gels and chopped into ~ 1 x 1 mm pieces after electrophoresis of extracts from both experimental conditions (LIM and LIM+Fe). In-gel digestion was performed according Niessen *et al.* (Niessen *et al.* 2006) Recovered peptides were loaded onto a single-phase column containing C18 resin as described. (Gatlin *et al.* 1998) The chromatographic separation consisted of an initial wash step with buffer A (5% ACN: 0.1% formic acid, v:v) for 10 min, and subsequent elution of peptides with a linear gradient from 0 – 100% buffer B (90% ACN: 0.1 % formic acid, v:v) over 110 min. The HPLC column eluent was directly transferred into the electrospray ionization source of an ion trap mass spectrometer (Finnigan LTQ-XL, Thermo, San Jose, CA). MS/MS dataset interpretations were performed as described above.

2.9. Peptidase activity assays

Protease and metalloprotease activity were tested upon fluorogenic substrates, including N-*t*-Boc-Gly-Arg-Arg-MCA (*t*-Boc, *tert*-Butyl carbamates; MCA, 7-amino-4-methylcoumarin) and N-*t*-Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA). All substrates were at a final concentration of 2 μ M in a total assay volume of 100 μ l. Kinetics of hydrolysis was monitored at 11 s-intervals by fluorimetry in a SpectraMax M2-e Microplate Reader (Molecular Devices Corporation, California, USA). The wavelength pair for excitation and emission was 370/ 460 nm. (Oliveira *et al.* 1992) Protein samples from *C. gattii* R265 cultures in LIM and LIM+Fe (10 μ l, 20 μ g of protein) conditions were incubated for 10 min at 37°C in Tris-HCl saline buffer, pH 7.2, in the presence or absence of specific

protease inhibitors 10 mM EDTA; 2 μ M pepstatin A; 10 μ M L-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)-butane (E-64) and, 100 μ M phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), prior substrate addition. Peptidase activity was given in nMoles of MCA calculated using a standard curve.

2.10. Western blot

For western blots, 20 μ g of *C. gattii* proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (37 kDa) was detected with polyclonal antisera against the recombinant GAPDH from *Paracoccidioides brasiliensis*. (Barbosa *et al.* 2006) As control, β -Tubulin (56.6 kDa) was detected using a polyclonal antiserum against β -Tubulin (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA). Protein expression levels were quantified with the ImageJ software (NIH, Maryland, USA).

2.11. Reductase activity

Cell surface reductase activity was measured by using the tetrazolium overlay technique as described previously. (Ogur *et al.* 1957; Jung *et al.* 2006)

3. RESULTS

3.1. MudPIT identifications

The proteins identified with two or more peptides are listed in Table S1-Supporting Information. Venn diagrams displaying the distribution, overlap, and reproducibility of the identified proteins for the three biological replicates of each condition are displayed in Figure 1A and B.

Our results include a total of 1080 non-redundant proteins identified from LIM and 1135 from LIM+Fe conditions (Figure 1C and Supplementary Table S2, Supporting Information).

3.2. Gene Ontology Analysis

A total of 725 proteins were found in at least 3 or more replicates; these proteins were selected for a GO analysis. Of these proteins, forty eight were exclusively identified when *C. gattii* was grown under iron deprivation (LIM); 16 were found to be uniquely expressed under iron replete, and the remaining were common to both conditions (Figure 1D).

GO annotation (Ashburner *et al.* 2000) provided a broad view of the *C. gattii* response to different conditions of iron availability (Figure 2). Ten heme binding proteins were identified in response to iron alteration, which suggest that *C. gattii* may also use heme as iron sources, as *C. neoformans*. (Jung & Kronstad 2008) Many proteins linked to structural constituent of ribosome (60 proteins), antioxidant

activity (12 proteins) and oxidoreductases activities (36 proteins) were observed in our analysis, which were also evidenced in a previous study in *C. neoformans*. (Lian *et al.* 2005) These results, together with a more complete classification in the GO categories are found on Supplementary Table S3 (Supporting Information).

3.3. Analysis of the Hypothetical proteins

A total of 183 proteins (about 23% of the all proteins detected in at least 3 replicates) were identified as hypothetical or conserved hypothetical proteins; these were treated separately as to not compromise the confidence in our global analysis. Their sequences were “BLASTed” against NCBI non-redundant databases and the result identified 30 of these proteins to have a high similarity with proteins from other closely related organisms: *C. neoformans* var. *neoformans* JEC21, *C. neoformans* var. *grubii*, and *Cryptococcus bacillisporus* (Table 1). Among the BLAST results we point out: glutamate synthase, isoprenoid biosynthesis, and cytochrome c oxidase. These proteins are related to biosynthetic pathways such as glutamate and nitrogen metabolism, and electron transport chain; they require iron as a cofactor. The results also included proteins involved in virulence mechanisms of *C. neoformans* and/or *C. gattii* (e.g. 14-3-3 protein, heat shock proteins (HSP) 12, HSP60, HSP70 and HSP90). (Jobbins *et al.* 2010; Maeng *et al.* 2010) One of these proteins (CNBG_3266), which had homology with HSP70 (Table 1), was upregulated (2.6-fold) in response to the LIM condition in our differential expression analysis.

The remaining proteins matched with hypothetical or conserved hypothetical proteins from *Cryptococcus*. Results from sequence analysis and gene ontology

annotation of all hypothetical proteins are available in Supplementary Table S4 (Supporting Information).

3.4. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathway Analysis

In order to identify pathways affected by iron in the culture medium we mapped the MudPIT results to the KEGG pathways database. (Kanehisa & Goto 2000) Ninety six different pathways were linked to proteins that were identified in both experimental conditions (LIM and LIM+Fe). On the other hand, proteins related to 15 pathways were exclusively detected in cultures of *C. gattii* in LIM. Threonine ammonia-lyase, a protein linked to four distinct pathways (biosynthesis of secondary metabolites; glycine, serine and threonine metabolism; valine, leucine and isoleucine biosynthesis; metabolic pathways) was only detected as a response to the incubation of *C. gattii* in LIM+Fe (Table S5, Supporting Information). A considerable number of the detected proteins were related to pathways linked to mitochondrial functions, including the citric acid (TCA) cycle, glycolysis/ gluconeogenesis, pentose phosphate pathway and oxidative phosphorylation. Indeed, many iron proteins and iron cofactors are related to mitochondrial activity.

3.5. Analysis of differentially expressed proteins

The semi-quantitative analysis of protein expression after growth of *C. gattii* in LIM or LIM+Fe was performed and a TFold comparison pinpointed 39 differentially expressed proteins. Of these, 12 and 27 proteins were upregulated after fungal growth in LIM (Table 2) and LIM+Fe (Table 3), respectively.

We found a peptidase related to the family of zinc-metallopeptidases to be the protein with the highest differential expression ratio (7.2 fold upregulated) after growth of *C. gattii* in LIM. Another peptidase, extracellular elastinolytic metalloproteinase, was 6.7-fold upregulated when the fungus was cultivated in LIM. These results were validated by peptidase activity assays. In all, fungal extracts obtained from cells grown in LIM showed an increased total protease activity when compared with extracts from cultures of *C. gattii* under iron availability (Figure 3). These results are in agreement with the augmented protease activity in fungal extracts obtained from cells grown in LIM (Figure 3).

Among the proteins related to metabolic processes highlighted in our comparative analysis, we point out the overexpressed enzymes in *C. gattii* grown under iron deprivation: 6-phosphogluconolactonase (5.6-fold), D-lactaldehyde dehydrogenase (3.8-fold), 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (3.6-fold) and GAPDH (2.7-fold). The later has been implicated in multiple functions such as glycolysis, transcription activation, initiation of apoptosis, and vesicle shuttling from endoplasmatic reticulum (ER) to Golgi. (Hwang *et al.* 2009; Broetto *et al.* 2010) The enzyme 6-phosphogluconolactonase has been described in participating in the oxidative phase of the pentose phosphate pathway, which is involved in the response to oxidative conditions, through the generation of NADPH, that serves as an electron source for reductases and antioxidants. (Dill *et al.* 2009) These results lead us to speculate that iron deprivation may result in oxidative damage response in *C. gattii*, which is commonly observed in other models.

It has been well-established that iron deprivation regulates the expression of virulence factors in *C. neoformans*, such as capsule formation and melanin production. (Zaragoza *et al.* 2003; Tangen *et al.* 2007; Jung & Kronstad 2008; Jung

et al. 2010) In our differential expression analysis an UDP-glucose dehydrogenase and a glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase were upregulated (2.9-fold and 6.9-fold, respectively) in *C. gattii* cultures under iron deprivation (LIM). UDP-glucose dehydrogenase catalyzes the conversion of UDP-glucose into UDP-glucuronic acid, which is one of the residues of the capsular component glucuronoxylomannan. (Moyrand & Janbon 2004) Sequence analysis of the GMC-oxidoreductase demonstrated a 95% amino acid identity with protein Smg1 (AAM83033) from *Filobasidiella neoformans*. Smg1 is suggested to play overlapping roles with signaling components in the regulation of the cAMP-signalling pathways. (Maeng *et al.* 2010) Protein *wos2*, associated with cell signaling, was also upregulated upon iron deprivation (3.5-fold). These observations suggest a link between iron deprivation and the expression of virulence factors in *C. gattii* R265.

A voltage-dependent ion-selective channel (VDAC) manifested the most expressive fold change in *C. gattii* cultures under iron deprivation (LIM) after cultivation of yeast cells in LIM+Fe (17-fold, in comparison with LIM). Since VDAC is involved with mitochondrial signaling (Shoshan-Barmatz *et al.* 2010), we speculate that it could participate in iron homeostasis, although this phenomenon has no precedent in the literature.

Our results show a fluctuation in the expression of metabolic proteins when *C. gattii* was cultivated in LIM or LIM+Fe (Table 2 and 3). As expected, proteins involved in mitochondrial pathways such as the TCA cycle (ATP citrate synthase, aconitase), glycolysis/gluconeogenesis (1,4-alpha glucan branching enzyme), pyruvate metabolism (malate synthase) and oxidative phosphorylation (ubiquinol-cytochrome C reductase, ATP synthase beta subunit, H⁺-transporting two sector ATPase subunit alpha) were upregulated. Proteins with roles in amino acid

metabolism (saccharopine dehydrogenase, glycine hydroxymethyltransferase, methionine adenosyltransferase), and fatty acid biosynthesis (acetyl-CoA carboxylase, acyl-CoA dehydrogenase, fatty acid synthase beta subunit) were highly expressed in *C. gattii* upon iron replete condition of growth. These metabolic response differences of *C. gattii* grown in LIM and LIM+Fe reflect the iron influence on regulation of catabolic and anabolic events, which was also evidenced in *C. neoformans*. (Lian *et al.* 2005)

Many proteins related to assembly of ribosome subunits (40S and 60S) were upregulated under iron availability (Table 3). This evidence, also described for *C. neoformans* (Lian *et al.* 2005), suggests that protein biosynthesis is in part modulated by iron in *C. gattii*.

3.6. Validation of differential protein expression analysis

Protease assays were applied to further validate the proteomic data. Figure 3 shows the activity against two 7-AMC substrates; the total protease and specific metalloprotease activities were higher when *C. gattii* was grown in LIM as compared to LIM+Fe.

GAPDH expression was also used as a prototype for experimental validation of differential expression proteomic results. The GAPDH western (Figure 4) confirmed our MudPIT result indicating a greater abundance when *C. gattii* was grown in LIM (2.7-fold, as compared to LIM+Fe).

3.7. A proteomic and transcriptomic comparison for *C. gattii*

Here we describe our observations in comparing the *C. neoformans* iron transcriptome (Lian *et al.* 2005) with our *C. gattii* proteomic data. Cfo1 (CNBG_4942 acidic laccase) and the iron regulator Cir1 (CNBG_5691 iron regulator) were expressed in both previously described transcriptomic and in our proteomic results for LIM and LIM+Fe. The former is paired with Cft1 and together are related to iron uptake (Jung *et al.* 2006; Jung *et al.* 2009); the latter was previously described as involved in virulence and iron homeostasis in *C. neoformans* (Table S2, Supporting Information). Cir1 is a general iron regulator that controls the transcript levels of iron-responsive genes. (Jung *et al.* 2006)

Cell surface reductase proteins, which are present in *C. neoformans*, were not identified in our proteomic data; therefore we carried out a TTC assay to evaluate the presence of cell surface reductase activity in *C. gattii*. As demonstrated on Supplemental Figure S1 (Supporting Information), *C. gattii* presented a cell surface reductase activity similar to that of *C. neoformans* (H99) grown on LIM and LIM+Fe condition.

Proteins related to siderophore uptake were not detected in our MudPIT protein data, but their presences are suggested in transcriptome data. (Tangen *et al.* 2007) This is an additional mechanism utilized by *C. neoformans* to acquire iron from environment. Our data suggest that *C. gattii* may have iron homeostasis-related proteins not similar to the proteins previously described in *C. neoformans*.

Some proteins were exclusively expressed when *C. gattii* was grown in LIM and we speculate that these proteins might influence iron homeostasis in this fungus. In this context, two proteins with distinct functions enrolled on endocytic pathway

were identified. The RAB small monomeric GTPase (CNBG_3206), which is part of RAB GTPases group, a large family of proteins with a variety of regulatory functions in membrane traffic; and the vacuolar protein sorting-associated protein vps27 (CNBG_5311) that is an endosomal protein required for recycling Golgi-proteins, to produce luminal membranes and to sort ubiquitinated proteins targeted for degradation. (Leung *et al.* 2008) Three distinct peptidases (carboxypeptidase C - CNBG_1925, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 12 - CNBG_2384, dipeptidyl-peptidase and tripeptidyl-peptidase - CNBG_5044) were also identified uniquely from *C. gattii* grown in LIM condition. This observation corroborates with our results concerning enhanced peptidase activity that *C. gattii* showed when grown in LIM as compared to LIM+Fe. In addition, a general transcriptional repressor protein (CNBG_3041), which has a tetratricopeptide repeat (TPR) motif, was expressed by *C. gattii* only in LIM. Most TPR-containing proteins are associated with multiprotein complexes, and there is extensive evidence indicating that TPR motifs are important to the functioning of chaperones, cell-cycle, transcription, and protein transport complexes. (Blatch & Lässle 1999)

3.8. Two- dimensional analysis and comparison with MudPIT results

According to comparative image analysis ten spots having differential volumes among classes were selected, excised from gels in both conditions, and identified using LC-MS/MS (Figure 5). A total of 61 proteins were identified. Table 4 shows the proteins identified by 2D-GE and the comparison of this analysis with the MudPIT data; an overlapping of some 90% (40 proteins) was observed when

comparing these two methodologies. Five of the proteins found after the combination of 2D-GE and LC-MS/MS were not found by MudPIT.

Although protein separation using 2D-GE is a powerful methodology, a single spot may contain more than one protein as frequently observed in LC-MS/MS analyses. (Lim *et al.* 2003) It is also important to note that of these 61 proteins, 16 of them were found in two or more different spots; this frequently happens due to protein isoforms or post-translational modifications. (Berkow & Dodson 1990; Ambatipudi *et al.* 2006)

To evaluate if the similarity of the global proteomic profile obtained using 2D-GE and MudPIT, we classified proteins from 2D-GE according to GO terms. Figure 6 shows that the functional profile was similar for both techniques. Nevertheless, 5 proteins were identified exclusively by 2D-GE showing that these methods can yield complementary results.

We also investigate pathways related to mitochondrial functions that were similarly represented using both approaches such as glycolysis/gluconeogenesis (CNBG_2246, CNBG_4625, CNBG_2828, CNBG_1866 and CNBG_3706), TCA cycle (CNBG_1185, CNBG_4625 and CNBG_2828), pentose phosphate pathway (CNBG_3166), and oxidative phosphorylation (CNBG_1632). The succinyl-CoA ligase beta-chain protein (involved in TCA cycle pathway, CNBG_1185), was identified only in 2D-GE being one of the most represented pathways by the KEGG analysis of our MudPIT data.

4. DISCUSSION

Shotgun proteomic techniques such as MudPIT are considered state-of-the-art tools for studying complex protein mixtures. (Washburn *et al.* 2001) MudPIT is able to identify thousands of proteins with great sensitivity and accuracy by using a combination of strong cation exchange with reverse phase chromatography. (Yates 2004) In our study, we applied MudPIT to investigate the proteomic profiling of *C. gattii* grown in low and high iron concentrations. More than 1,000 proteins were identified in both conditions tested; we believe this is the most extensive effort so far to characterize this organism's proteome.

Iron is essential to most living organisms and they have developed sophisticated ways to use this element in their regular metabolisms. For pathogenic microbes, iron is required for the expression of virulence factors and, consequently, for the success of the infectious process. (Weinberg 2004; Sutak *et al.* 2008) Many studies evaluating the response of pathogens to iron starvation have been developed. (Ramanan & Wang 2000; Knight *et al.* 2005; Ratledge 2007; Vidakovics *et al.* 2007; Sutak *et al.* 2008; Cherayil 2010; Pieper *et al.* 2010) In *C. neoformans*, the metabolic machinery required for iron homeostasis has been studied in details. (Jacobson *et al.* 1998; Lian *et al.* 2005; Jung *et al.* 2006; Jung & Kronstad 2008; Jung *et al.* 2008; Jung *et al.* 2009; Jung & Kronstad 2010; Jung *et al.* 2010) Proteins operating in this system include exported reductants, cell surface reductases, a permease/ferroxidase complex for iron uptake, siderophore utilization (iron bound to siderophores secreted by other microbes) and iron sensing/regulation proteins. (Silva *et al.* 2011)(Jung & Kronstad 2008) These elements are determinant for

virulence mechanisms in this pathogen. Although the studies mentioned above have been based in different approaches, the comparison of our MudPIT data obtained with *C. gattii* and the *C. neoformans* literature revealed a similar global response after exposure of the fungus to iron starvation or availability. For example, proteins related to metabolic pathways such as TCA cycle, glycolysis/gluconeogenesis, oxidative phosphorylation were upregulated in iron replete condition in both *C. gattii* and *C. neoformans*. (Lian *et al.* 2005) Similar results were observed for proteins required for assembly of ribosomal subunits, which demonstrate that protein biosynthesis is affected under iron deprivation in both species. However, we observed that the majority of proteins described as regulators of iron homeostasis in *C. neoformans* were not identified in our proteomic analysis. Of these proteins, we only identified, in low abundance, one iron uptake protein (Cfo1) and the iron regulator Cir1. Cfo1 is a ferroxidase required for the utilization of inorganic iron and transferring, and for full virulence. (Jung *et al.* 2009) Cir1 is responsible for the transcriptional response to iron by regulation both iron uptake and the expression of the major cryptococcal virulence factors. (Jung *et al.* 2006) Although global response to iron deprivation was similar between *C. gattii* and *C. neoformans*, our results suggest their iron machinery to have some distinctions (Figure 7).

Alterations in iron triggering are related to many cellular disorders, mainly because iron cofactors activate enzymes involved in essential metabolic processes. For example, iron cofactors are involved in DNA repair, xenobiotic metabolism, and biosynthesis of amino acids, proteins, sterols and fatty acids. (Sutak *et al.* 2008) Iron-related proteins are required for oxidation of acetyl CoA via the TCA cycle and generation of ATP via oxidative phosphorylation. Synthesis of heme and iron-sulfur clusters need iron to occur. (Ozer & Bruick 2007; Shakoury-Elizeh *et al.* 2010)

Although iron homeostasis is clearly essential for cellular metabolism, little is known about the specific molecular mechanisms required to override iron deficiency. Studies in *S. cerevisiae* indicate this yeast responds to iron deficiency by activating iron uptake systems, mobilizing iron stores, optimizing metal use and regulating gene expression at both transcriptional and posttranscriptional levels. (Philpott & Protchenko 2008) With regards to posttranscriptional mechanisms, under iron starvation, yeast cells activate the expression of proteins that degrade mRNAs encoding proteins involved in iron pathways. (Puig *et al.* 2008; Shakoury-Elizeh *et al.* 2010) This mechanism has also been described in bacteria. (Masse *et al.* 2007) In our study, two metalloproteases were highly expressed under iron starvation (Table 2). Evaluation of specific metalloprotease activity of cytoplasmic extract of *C. gattii* grown in LIM and LIM+Fe showed a correlation between activity and protein abundance (Figure 3). Total protease activity was also more accentuated in *C. gattii* after growth in LIM than LIM+Fe and this evidence is in accordance to the presence of 3 distinct peptidases identified uniquely from *C. gattii* grown in LIM. These observations led us to hypothesize that a post-translational regulation may occur in *C. gattii* under iron deprivation, which might utilize proteases to degrade iron-dependent proteins or iron cofactors. Further experiments are required to rigorously prove this hypothesis (Figure 7).

Studies in *C. neoformans* demonstrated that iron regulates the expression of classical virulence factors such as production of a polysaccharide capsule, the deposition of melanin at the cell wall, and the ability to grow at 37 °C. (Jung *et al.* 2006; Jung *et al.* 2009; Jung & Kronstad 2010) Similar observations were described for bacterial pathogens. (Ratledge & Dover 2000; Radtke & O'Riordan 2006; Ratledge 2007) In our study, the UDP-glucose dehydrogenase related to capsule

formation was highly expressed after growth of *C. gattii* in LIM. It is a key enzyme involved in the biosynthesis of UDP-glucuronic acid, which is part of the main capsule component called glucuronoxylomannan (GXM). GMC-oxidoreductase, also called Smg1 protein, was also upregulated under these conditions. This protein is likely involved in the regulation of cAMP-signaling pathways. Considering that these pathways are indirectly enrolled in capsule and melanin production in *C. neoformans* (Alspaugh *et al.* 2002; Pukkila-Worley *et al.* 2005), we speculate that a correlation between iron levels and the expression of virulence factors may exist in *C. gattii*.

The mitochondrion has a crucial role in maintaining cellular iron homeostasis. Ma and colleagues, (Ma *et al.* 2009) analyzed 24 *C. gattii* Vancouver Island isolates and proposed that they have a change in mitochondrial regulation, which led to a particular increased capacity to survive and proliferate inside macrophages resulting in a hypervirulent phenotype. As cited above, *C. gattii* R265 was isolated from patients of the Vancouver Island outbreak. (Kidd *et al.* 2004) In our study, we observed that proteins involved in TCA cycle, glycolysis/gluconeogenesis and oxidative phosphorylation were more abundantly expressed when iron was available in the culture medium, suggesting that iron depletion affects the mitochondrial function in *C. gattii*. Another mitochondrion-related protein affected by iron availability was VDAC, a gatekeeper for the entry and exit of mitochondrial metabolites. (Shoshan-Barmatz *et al.* 2010) This molecule was highly expressed in our LIM+Fe condition. The connections of VDAC with iron metabolism are still unknown, but our results suggest that this protein is putatively involved in maintaining iron homeostasis in *C. gattii*. Additional experimentation is required to evaluate if iron levels influence the hypervirulent genotype of the R265 isolate of *C. gattii*.

As well-described previously, MudPIT is a high-throughput methodology for analyses of proteomes showing unquestionable better performance than gel-based analysis. However, this technique is still not as popular as two-dimensional gel electrophoresis, even for analyzing complex mixtures. (Gygi *et al.* 2000; Kline & Wu 2009) Therefore, we performed 2D-GE with same conditions used in MudPIT analysis and we compared the results. The functional profile of proteins identified from 2D-GE gels matched with the profile obtained in MudPIT data. Nevertheless, in our hands, the approaches showed to be somewhat complementary.

To our knowledge, our data provide the first efforts in describing a proteomic view of iron deprivation in *C. gattii*. Future transcriptional and metabolic studies will be required to further validate these data and the role of iron homeostasis in this emerging pathogenic species.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information Available

Supplemental Tables S1 - S5 and Supplemental Figure S1 are available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Prof. Marcio Lourenço Rodrigues for kindly revising the manuscript and for his invaluable suggestions. This work was supported by Brazilian Grants from CNPq,

CAPES and MCT/FINEP/Rede GENOPROT (grant number 01.07.0552.00) and by NIH P41-RR011823. PCC was funded by CAPES-Fiocruz 30/2006 and PDTIS. JC is a Ph.D. student at Centro de Biotecnologia (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil) and received a scholarship (grant number 201227/2009-6) for a 6 months stay at The Scripps Research Institute, USA.

REFERENCES

- Alspaugh J.A., Pukkila-Worley R., Harashima T., Cavallo L.M., Funnell D., Cox G.M., Perfect J.R., Kronstad J.W. & Heitman J. (2002). Adenylyl cyclase functions downstream of the Galpha protein Gpa1 and controls mating and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 1, 75-84.
- Ambatipudi K., Old J., Guilhaus M., Raftery M., Hinds L. & Deane E. (2006). Proteomic analysis of the neutrophil proteins of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). In: *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* Netherlands, pp. 283-91.
- Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A., Botstein D., Butler H., Cherry J.M., Davis A.P., Dolinski K., Dwight S.S., Eppig J.T., Harris M.A., Hill D.P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J.C., Richardson J.E., Ringwald M., Rubin G.M. & Sherlock G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*, 25, 25-9.
- Barbosa M.S., Bao S.N., Andreotti P.F., de Faria F.P., Felipe M.S., dos Santos Feitosa L., Mendes-Giannini M.J. & Soares C.M. (2006). Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. In: *Infect Immun* United States, pp. 382-9.
- Barluzzi R., Saleppico S., Nocentini A., Boelaert J.R., Neglia R., Bistoni F. & Blasi E. (2002). Iron overload exacerbates experimental meningoencephalitis by *Cryptococcus neoformans*. *J Neuroimmunol*, 132, 140-6.
- Benjamini Y. & Hochberg Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B*, 57, 289-300.
- Berkow R.L. & Dodson R.W. (1990). Tyrosine-specific protein phosphorylation during activation of human neutrophils. *Blood*, 75, 2445-52.
- Blatch G. & Lässle M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays*, 21, 932-939.

- Broetto L., Da Silva W.O., Bailao A.M., De Almeida Soares C., Vainstein M.H. & Schrank A. (2010). Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: cell-surface localization and role in host adhesion. *FEMS Microbiol Lett*, 312, 101-9.
- Carrozza M.J., Florens L., Swanson S.K., Shia W.J., Anderson S., Yates J., Washburn M.P. & Workman J.L. (2005). Stable incorporation of sequence specific repressors Ash1 and Ume6 into the Rpd3L complex. In: *Biochim Biophys Acta Netherlands*, pp. 77-87; discussion 75-6.
- Carvalho P.C., Fischer J.S., Chen E.I., Domont G.B., Carvalho M.G., Degraeve W.M., Yates J.R. & Barbosa V.C. (2009). GO Explorer: A gene-ontology tool to aid in the interpretation of shotgun proteomics data. *Proteome Sci*, 7, 6.
- Carvalho P.C., Fischer J.S., Chen E.I., Yates J.R., 3rd & Barbosa V.C. (2008). PatternLab for proteomics: a tool for differential shotgun proteomics. In: *BMC Bioinformatics England*, p. 316.
- Carvalho P.C., Yates J.R. & Barbosa V.C. (2010). Analyzing shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics. *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 13, Unit 13.13.1-15.
- Casadevall A. & Perfect J.R. (1998). *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington, D.C.
- Chayakulkeeree M. & Perfect J.R. (2006). Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*, 20, 507-44, v-vi.
- Cherayil B.J. (2010). The role of iron in the immune response to bacterial infection. *Immunol Res*.
- Conesa A., Gotz S., Garcia-Gomez J.M., Terol J., Talon M. & Robles M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. In: *Bioinformatics England*, pp. 3674-6.
- D'Souza C.A., Kronstad J.W., Taylor G., Warren R., Yuen M., Hu G., Jung W.H., Sham A., Kidd S.E., Tangen K., Lee N., Zeilmaker T., Sawkins J., McVicker G., Shah S., Gnerre S., Griggs A., Zeng Q., Bartlett K., Li W., Wang X., Heitman J., Stajich J.E., Fraser J.A., Meyer W., Carter D., Schein J., Krzywinski M., Kwon-Chung K.J., Varma A., Wang J., Brunham R., Fyfe M., Ouellette B.F., Siddiqui A., Marra M., Jones S., Holt R., Birren B.W., Galagan J.E. & Cuomo C.A. (2011). Genome Variation in *Cryptococcus gattii*, an Emerging Pathogen of Immunocompetent Hosts. In: *MBio United States*.
- Dill B.D., Dessus-Babus S. & Raulston J.E. (2009). Identification of iron-responsive proteins expressed by *Chlamydia trachomatis* reticulate bodies during intracellular growth. In: *Microbiology England*, pp. 210-9.
- Dimmer K.S. & Rapaport D. (2008). Proteomic view of mitochondrial function. In: *Genome Biol England*, p. 209.
- Duncan C., Stephen C. & Campbell J. (2006). Clinical characteristics and predictors of mortality for *Cryptococcus gattii* infection in dogs and cats of southwestern British Columbia. *Can Vet J*, 47, 993-8.
- Eng J., McCormack A. & Yates J.R. (1994). An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 5, 976-989.
- Fischer J.S., Liao L., Carvalho P.C., Barbosa V.C., Domont G.B., Carvalho M.G. & Yates J.R., 3rd (2010). Dynamic proteomic overview of glioblastoma cells (A172) exposed to perillyl alcohol. In: *J Proteomics*. 2010 Elsevier B.V Netherlands, pp. 1018-27.

- Florens L., Washburn M.P., Raine J.D., Anthony R.M., Grainger M., Haynes J.D., Moch J.K., Muster N., Sacci J.B., Tabb D.L., Witney A.A., Wolters D., Wu Y., Gardner M.J., Holder A.A., Sinden R.E., Yates J.R. & Carucci D.J. (2002). A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*, 419, 520-6.
- Frealle E., Noel C., Viscogliosi E., Camus D., Dei-Cas E. & Delhaes L. (2005). Manganese superoxide dismutase in pathogenic fungi: an issue with pathophysiological and phylogenetic involvements. In: *FEMS Immunol Med Microbiol* Netherlands, pp. 411-22.
- Galanis E. & Macdougall L. (2010). Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. *Emerg Infect Dis*, 16, 251-7.
- Gatlin C.L., Kleemann G.R., Hays L.G., Link A.J. & Yates J.R., 3rd (1998). Protein identification at the low femtomole level from silver-stained gels using a new fritless electrospray interface for liquid chromatography-microspray and nanospray mass spectrometry. In: *Anal Biochem*. 1998 Academic Press. United States, pp. 93-101.
- Gotz S., Garcia-Gomez J.M., Terol J., Williams T.D., Nagaraj S.H., Nueda M.J., Robles M., Talon M., Dopazo J. & Conesa A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. In: *Nucleic Acids Res* England, pp. 3420-35.
- Graumann J., Dunipace L.A., Seol J.H., McDonald W.H., Yates J.R., Wold B.J. & Deshaies R.J. (2004). Applicability of tandem affinity purification MudPIT to pathway proteomics in yeast. *Mol Cell Proteomics*, 3, 226-37.
- Gygi S.P., Corthals G.L., Zhang Y., Rochon Y. & Aebersold R. (2000). Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 9390-5.
- Hicks J.K. & Heitman J. (2007). Divergence of protein kinase A catalytic subunits in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* illustrates evolutionary reconfiguration of a signaling cascade. *Eukaryot Cell*, 6, 413-20.
- Hwang N.R., Yim S.H., Kim Y.M., Jeong J., Song E.J., Lee Y., Lee J.H., Choi S. & Lee K.J. (2009). Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular functions. In: *Biochem J* England, pp. 253-64.
- Idnurm A., Bahn Y.S., Nielsen K., Lin X., Fraser J.A. & Heitman J. (2005). Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol*, 3, 753-64.
- Jacobson E.S., Goodner A.P. & Nyhus K.J. (1998). Ferrous iron uptake in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 66, 4169-75.
- Jobbins S.E., Hill C.J., D'Souza-Basseal J.M., Padula M.P., Herbert B.R. & Krockenberger M.B. (2010). Immunoproteomic approach to elucidating the pathogenesis of cryptococcosis caused by *Cryptococcus gattii*. *J Proteome Res*, 9, 3832-41.
- Jung W.H., Hu G., Kuo W. & Kronstad J.W. (2009). Role of ferroxidases in iron uptake and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 8, 1511-20.
- Jung W.H. & Kronstad J.W. (2008). Iron and fungal pathogenesis: a case study with *Cryptococcus neoformans*. *Cell Microbiol*, 10, 277-84.
- Jung W.H. & Kronstad J.W. (2010). The iron-responsive, GATA-type transcription factor *cir1* influences mating in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cells*.
- Jung W.H., Saikia S., Hu G., Wang J., Fung C.K., D'Souza C., White R. & Kronstad J.W. (2010). HapX positively and negatively regulates the transcriptional

- response to iron deprivation in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog*, 6, e1001209.
- Jung W.H., Sham A., Lian T., Singh A., Kosman D.J. & Kronstad J.W. (2008). Iron source preference and regulation of iron uptake in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog*, 4, e45.
- Jung W.H., Sham A., White R. & Kronstad J.W. (2006). Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biol*, 4, e410.
- Kanehisa M. & Goto S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. In: *Nucleic Acids Res England*, pp. 27-30.
- Kidd S.E., Hagen F., Tschärke R.L., Huynh M., Bartlett K.H., Fyfe M., Macdougall L., Boekhout T., Kwon-Chung K.J. & Meyer W. (2004). A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 17258-63.
- Kline K.G. & Wu C.C. (2009). MudPIT analysis: application to human heart tissue. *Methods Mol Biol*, 528, 281-93.
- Knight S.A., Vilaire G., Lesuisse E. & Dancis A. (2005). Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. *Infect Immun*, 73, 5482-92.
- Koller A., Washburn M.P., Lange B.M., Andon N.L., Deciu C., Haynes P.A., Hays L., Schieltz D., Ulaszek R., Wei J., Wolters D. & Yates J.R. (2002). Proteomic survey of metabolic pathways in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11969-74.
- Kronstad J.W., Attarian R., Cadieux B., Choi J., D'Souza C.A., Griffiths E.J., Geddes J.M., Hu G., Jung W.H., Kretschmer M., Saikia S. & Wang J. (2011). Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. In: *Nat Rev Microbiol England*, pp. 193-203.
- Latouche G.N., Sorrell T.C. & Meyer W. (2002). Isolation and characterisation of the phospholipase B gene of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *FEMS Yeast Res*, 2, 551-61.
- Lester S.J., Malik R., Bartlett K.H. & Duncan C.G. (2011). Cryptococcosis: update and emergence of *Cryptococcus gattii*. *Vet Clin Pathol*.
- Leung K., Dacks J. & Field M. (2008). Evolution of the Multivesicular Body ESCRT Machinery; Retention across the Eukaryotic lineage. *Traffic*, 9, 1-18.
- Lian T., Simmer M.I., D'Souza C.A., Steen B.R., Zuyderduyn S.D., Jones S.J., Marra M.A. & Kronstad J.W. (2005). Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, 55, 1452-72.
- Lim H., Eng J., Yates J.R., 3rd, Tollaksen S.L., Giometti C.S., Holden J.F., Adams M.W., Reich C.I., Olsen G.J. & Hays L.G. (2003). Identification of 2D-gel proteins: a comparison of MALDI/TOF peptide mass mapping to mu LC-ESI tandem mass spectrometry. In: *J Am Soc Mass Spectrom United States*, pp. 957-70.
- Litvintseva A.P., Thakur R., Reller L.B. & Mitchell T.G. (2005). Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. In: *J Infect Dis United States*, pp. 888-92.
- Ma H., Hagen F., Stekel D.J., Johnston S.A., Sionov E., Falk R., Polacheck I., Boekhout T. & May R.C. (2009). The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 12980-5.

- Maeng S., Ko Y.J., Kim G.B., Jung K.W., Floyd A., Heitman J. & Bahn Y.S. (2010). Comparative transcriptome analysis reveals novel roles of the Ras and cyclic AMP signaling pathways in environmental stress response and antifungal drug sensitivity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 9, 360-78.
- Masse E., Salvail H., Desnoyers G. & Arguin M. (2007). Small RNAs controlling iron metabolism. In: *Curr Opin Microbiol* England, pp. 140-5.
- McDonald W.H., Tabb D.L., Sadygov R.G., MacCoss M.J., Venable J., Graumann J., Johnson J.R., Cociorva D. & Yates J.R. (2004). MS1, MS2, and SQT-three unified, compact, and easily parsed file formats for the storage of shotgun proteomic spectra and identifications. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 18, 2162-8.
- Morgan J., McCarthy K.M., Gould S., Fan K., Arthington-Skaggs B., Iqbal N., Stamey K., Hajjeh R.A. & Brandt M.E. (2006). *Cryptococcus gattii* infection: characteristics and epidemiology of cases identified in a South African province with high HIV seroprevalence, 2002-2004. In: *Clin Infect Dis* United States, pp. 1077-80.
- Moyrand F. & Janbon G. (2004). UGD1, encoding the *Cryptococcus neoformans* UDP-glucose dehydrogenase, is essential for growth at 37 degrees C and for capsule biosynthesis. *Eukaryot Cell*, 3, 1601-8.
- Narasipura S.D., Chaturvedi V. & Chaturvedi S. (2005). Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. In: *Mol Microbiol* England, pp. 1782-800.
- Ngamskulrungraj P., Gilgado F., Faganello J., Litvintseva A.P., Leal A.L., Tsui K.M., Mitchell T.G., Vainstein M.H. & Meyer W. (2009a). Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. *PLoS One*, 4, e5862.
- Ngamskulrungraj P., Himmelreich U., Breger J.A., Wilson C., Chayakulkeeree M., Krockenberger M.B., Malik R., Daniel H.M., Toffaletti D., Djordjevic J.T., Mylonakis E., Meyer W. & Perfect J.R. (2009b). The trehalose synthesis pathway is an integral part of the virulence composite for *Cryptococcus gattii*. *Infect Immun*, 77, 4584-96.
- Ngamskulrungraj P., Price J., Sorrell T., Perfect J.R. & Meyer W. (2011). *Cryptococcus gattii* Virulence Composite: Candidate Genes Revealed by Microarray Analysis of High and Less Virulent Vancouver Island Outbreak Strains. *PLoS One*, 6, e16076.
- Nicol A.M., Hurrell C., McDowall W., Bartlett K. & Elmieh N. (2008). Communicating the risks of a new, emerging pathogen: the case of *Cryptococcus gattii*. *Risk Anal*, 28, 373-86.
- Niessen S., Mcleod I. & Yates J.r. (2006). Silver Staining, Digestion, and Extraction of Peptides from an Acrylamide Gel for MS Analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*.
- Ogur M., St. John R. & Nagai S. (1957). Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast. *Science*, 125, 928-9.
- Oliveira M.C., Hirata I.Y., Chagas J.R., Boschcov P., Gomes R.A., Figueiredo A.F. & Juliano L. (1992). Intramolecularly quenched fluorogenic peptide substrates for human renin. In: *Anal Biochem* United States, pp. 39-46.
- Ozer A. & Bruick R.K. (2007). Non-heme dioxygenases: cellular sensors and regulators jelly rolled into one? In: *Nat Chem Biol* United States, pp. 144-53.

- Philpott C.C. & Protchenko O. (2008). Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 7, 20-7.
- Pieper R., Huang S.T., Parmar P.P., Clark D.J., Alami H., Fleischmann R.D., Perry R.D. & Peterson S.N. (2010). Proteomic analysis of iron acquisition, metabolic and regulatory responses of *Yersinia pestis* to iron starvation. In: *BMC Microbiol* England, p. 30.
- Puig S., Vergara S.V. & Thiele D.J. (2008). Cooperation of two mRNA-binding proteins drives metabolic adaptation to iron deficiency. In: *Cell Metab* United States, pp. 555-64.
- Pukkila-Worley R., Gerrald Q.D., Kraus P.R., Boily M.J., Davis M.J., Giles S.S., Cox G.M., Heitman J. & Alspaugh J.A. (2005). Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. *Eukaryot Cell*, 4, 190-201.
- Radtke A. & O'Riordan M. (2006). Intracellular innate resistance to bacterial pathogens. *Cell Microbiol*, 8, 1720-1729.
- Ramanan N. & Wang Y. (2000). A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science*, 288, 1062-4.
- Ratledge C. (2007). Iron metabolism and infection. *Food Nutr Bull*, 28, S515-23.
- Ratledge C. & Dover L.G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. In: *Annu Rev Microbiol* United States, pp. 881-941.
- Ren P., Springer D.J., Behr M.J., Samsonoff W.A., Chaturvedi S. & Chaturvedi V. (2006). Transcription factor STE12alpha has distinct roles in morphogenesis, virulence, and ecological fitness of the primary pathogenic yeast *Cryptococcus gattii*. *Eukaryot Cell*, 5, 1065-80.
- Shakoury-Elizeh M., Protchenko O., Berger A., Cox J., Gable K., Dunn T.M., Prinz W.A., Bard M. & Philpott C.C. (2010). Metabolic response to iron deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 285, 14823-33.
- Shoshan-Barmatz V., De Pinto V., Zweckstetter M., Raviv Z., Keinan N. & Arbel N. (2010). VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. In: *Mol Aspects Med* England, pp. 227-85.
- Silva M., Schrank A., Bailão E.F., Bailão A.M., Borges C.L., Staats C.C., Parente J.A., Pereira M., Salem-Izacc S.M., Mendes-Giannini M.J.S., Zancopé-Oliveira R.M., Rosa e Silva L.K., Nosanchuk J.D., Vainstein M.H. & Soares C.M. (2011). The homeostasis of iron, copper and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii*: A comparative analysis. *Frontiers in Microbiology*, 2, 1 - 15.
- Sorrell T.C. (2001). *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol*, 39, 155-68.
- Sutak R., Lesuisse E., Tachezy J. & Richardson D.R. (2008). Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. *Trends Microbiol*, 16, 261-8.
- Tabb D.L., McDonald W.H. & Yates J.R., 3rd (2002). DTASelect and Contrast: tools for assembling and comparing protein identifications from shotgun proteomics. *J Proteome Res*, 1, 21-6.
- Tangen K.L., Jung W.H., Sham A.P., Lian T. & Kronstad J.W. (2007). The iron- and cAMP-regulated gene SIT1 influences ferrioxamine B utilization, melanization and cell wall structure in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 153, 29-41.
- Vidakovics M.L., Paba J., Lamberti Y., Ricart C.A., de Sousa M.V. & Rodriguez M.E. (2007). Profiling the *Bordetella pertussis* proteome during iron starvation. *J Proteome Res*, 6, 2518-28.

- Washburn M.P., Ulaszek R.R. & Yates J.R. (2003). Reproducibility of quantitative proteomic analyses of complex biological mixtures by multidimensional protein identification technology. *Anal Chem*, 75, 5054-61.
- Washburn M.P., Wolters D. & Yates J.R. (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol*, 19, 242-7.
- Weinberg E.D. (2004). Suppression of bacterial biofilm formation by iron limitation. *Med Hypotheses*, 63, 863-5.
- Wright L.C., Payne J., Santangelo R.T., Simpanya M.F., Chen S.C., Widmer F. & Sorrell T.C. (2004). Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*. In: *Biochem J* England, pp. 377-84.
- Wu C.C., MacCoss M.J., Mardones G., Finnigan C., Mogelsvang S., Yates J.R. & Howell K.E. (2004). Organellar proteomics reveals Golgi arginine dimethylation. *Mol Biol Cell*, 15, 2907-19.
- Yates J.R., 3rd (2004). Mass spectral analysis in proteomics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 33, 297-316.
- Zaragoza O., Fries B.C. & Casadevall A. (2003). Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂. *Infect Immun*, 71, 6155-64.
- Zybailov B., Mosley A.L., Sardi M.E., Coleman M.K., Florens L. & Washburn M.P. (2006). Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Proteome Res*, 5, 2339-47.

Figures and Tables

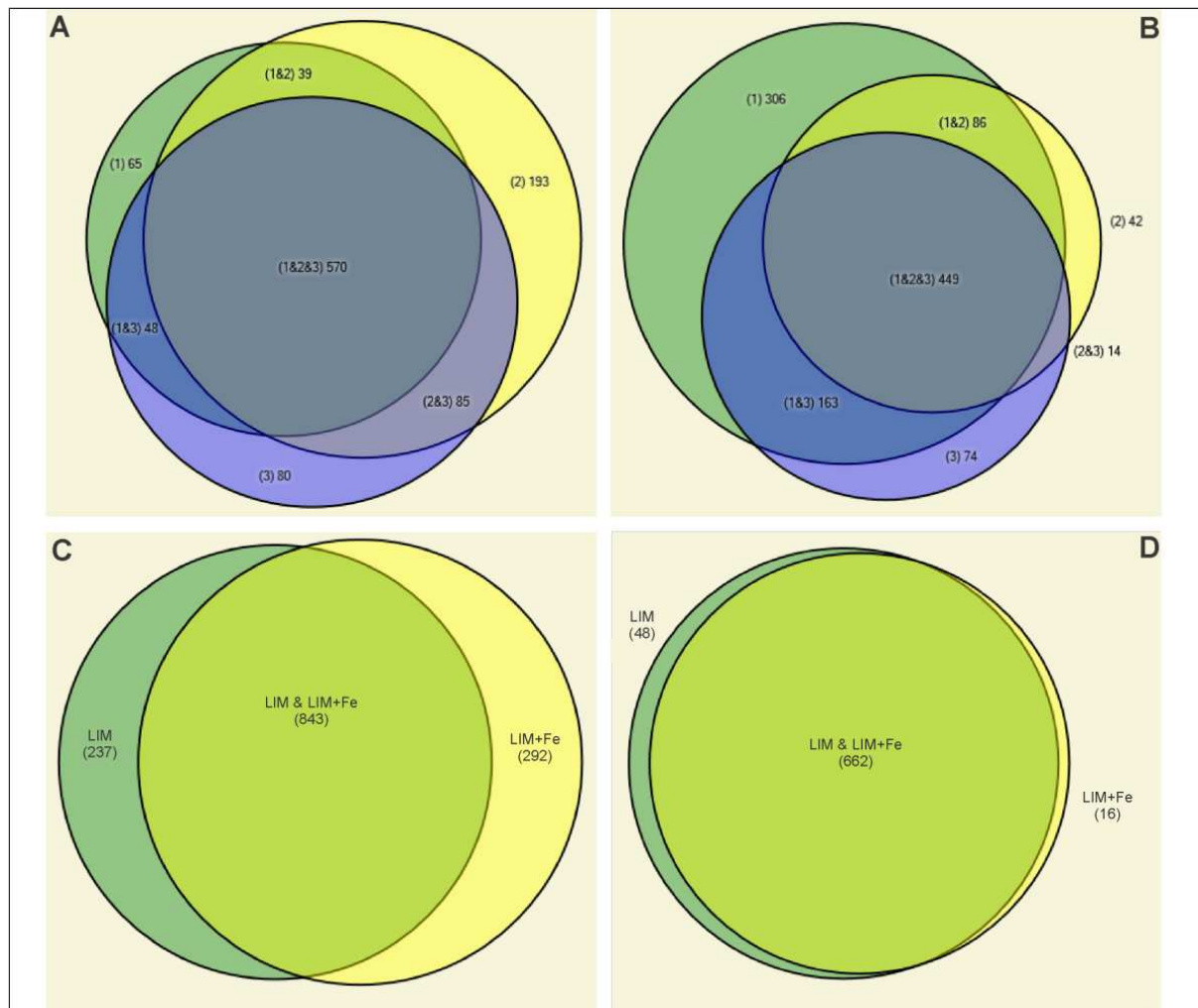


Figure 1. Distribution of proteins of *C. gattii* obtained after growth of the fungus in LIM and LIM+Fe. Figures A and B represent the distribution and overlap between the biological replicates from LIM (A) and LIM+Fe (B). Figures C and D show the dispersion of total proteins identified in both conditions, including proteins identified in at least 1 replicate of each condition and proteins present in a minimum of 3 replicates, respectively.

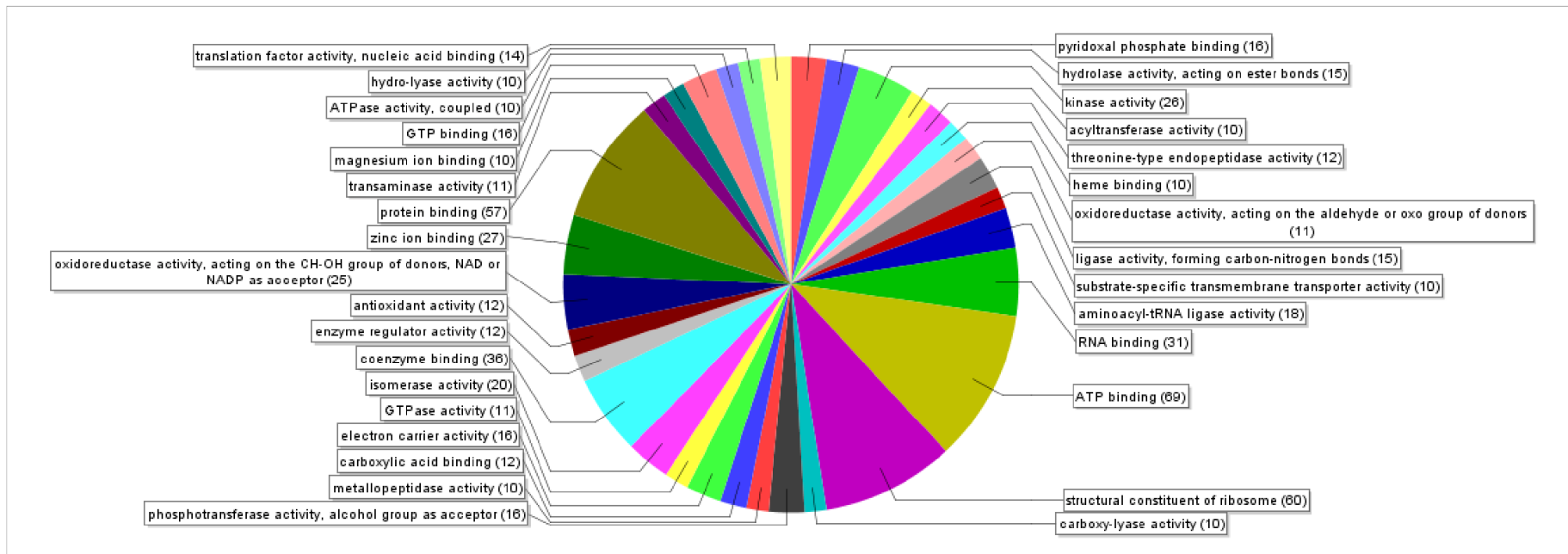


Figure 2. Gene ontology annotation. Molecular functions are represented at multilevel, using a cutoff of 10 sequences, for proteins obtained from LIM and LIM+Fe conditions.

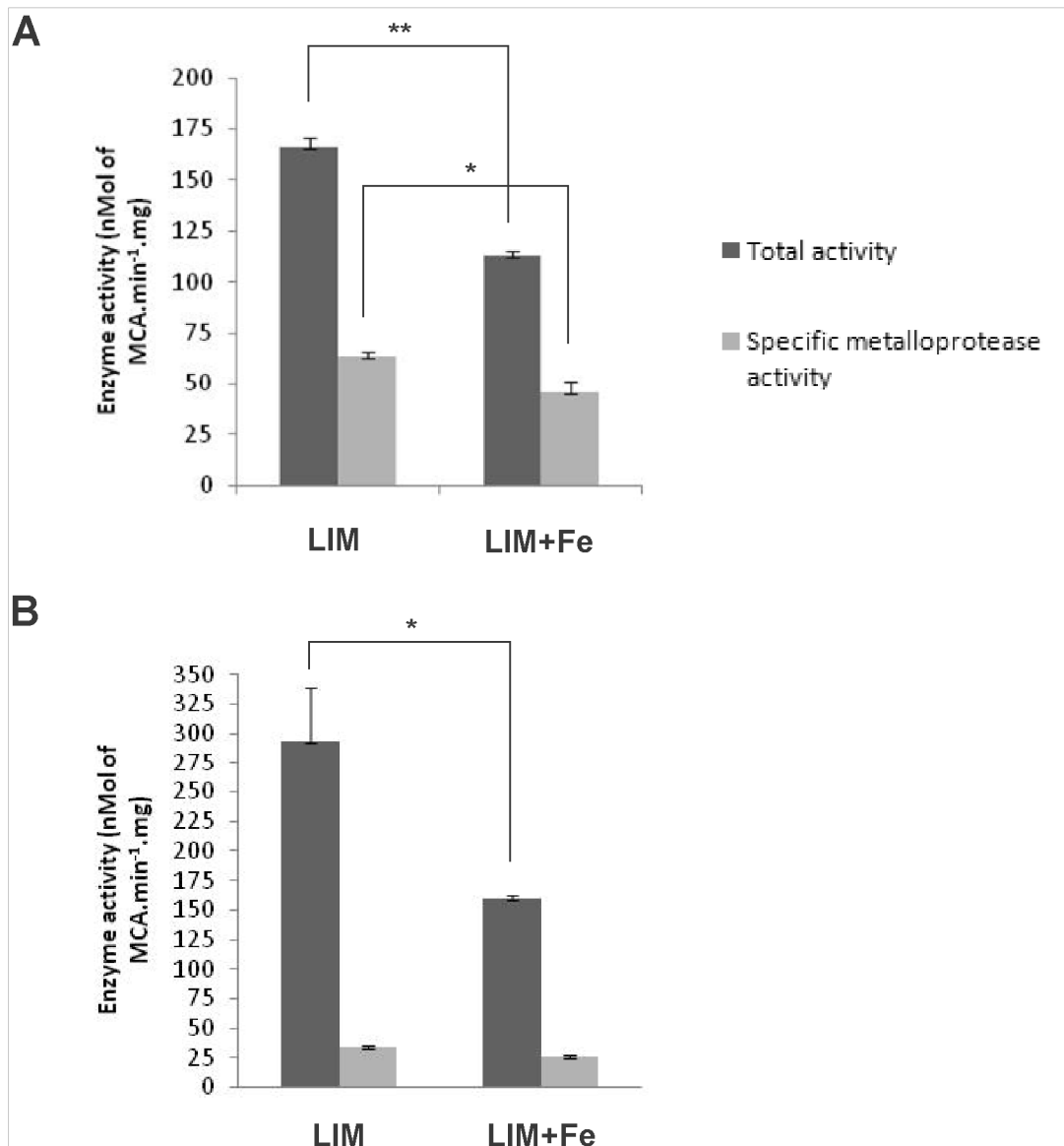


Figure 3. Peptidase activity of cytoplasmic extracts of *C. gattii* grown in LIM or LIM+Fe against two different fluorogenic substrates. Substrates *N-t-Boc-Gly-Arg-Arg-MCA* (A) and *N-t-Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA* (B) were used in this analysis.

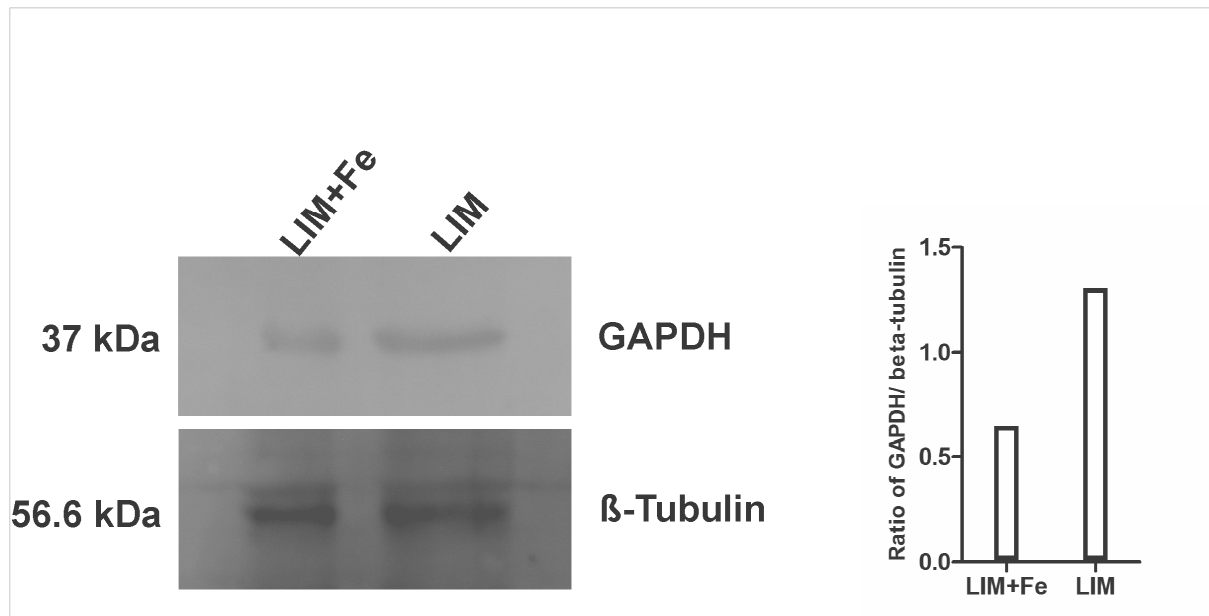


Figure 4. GAPDH expression under iron deprivation or availability to *C. gattii* cells, determined by western blotting. β -tubulin antibody was used as control of assay.

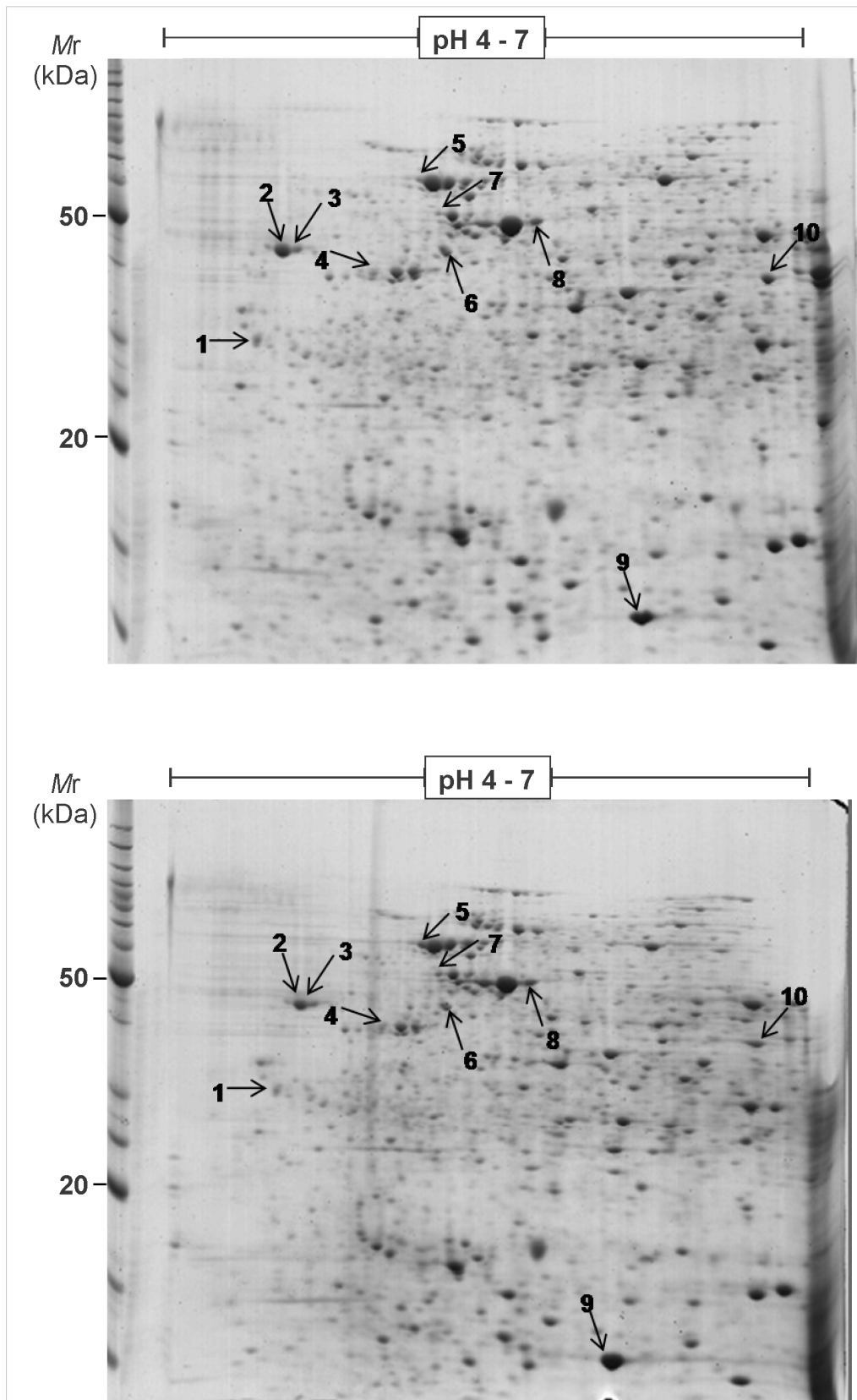


Figure 5. Two-dimensional gels from *C. gattii* grown in iron-depleted (A) and iron replete conditions (B). Arrows indicate spots submitted to LC-MS/MS identification.

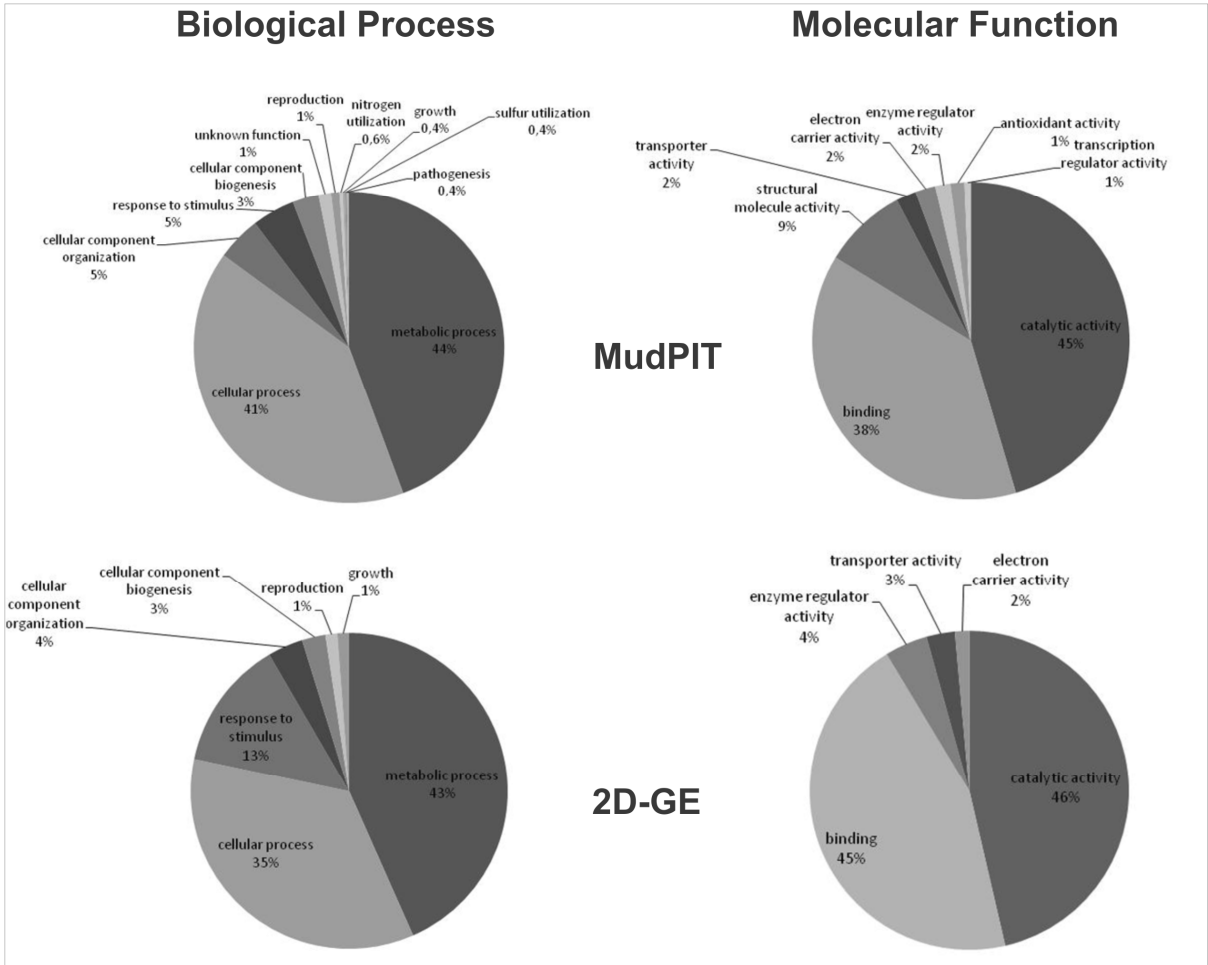


Figure 6. Comparison of functional proteomic profiles obtained using MudPIT and 2D-GE techniques. Proteins were annotated according with biological processes and molecular functions terms (level 2) using Blast2GO tool.

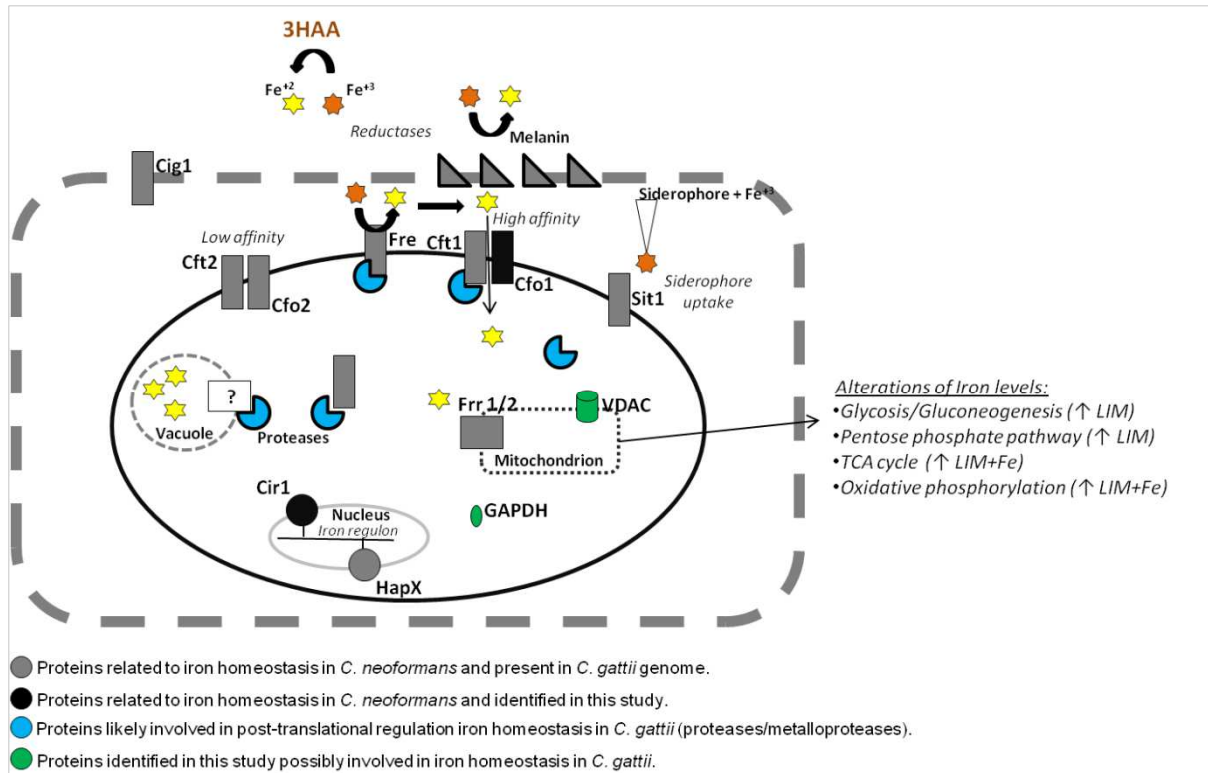


Figure 7. Schematic representation of iron homeostasis in *C. gattii*. Cfo1 and Cir1 are involved in iron homeostasis and virulence in *C. neoformans* and they were identified in this study in *C. gattii*. Many proteins related to iron in *C. neoformans* were detected in *C. gattii* genome. Protease activities were more detected under iron deprivation in *C. gattii* and may be involved in post-translational regulation to maintain iron homeostasis. Figure adapted from Jung & Kronstad, 2008.

Table 1. Putative classification of *C. gattii* hypothetical proteins.

BROAD ID	NCBI ID	NCBI Sequence description	Related-species	e-Value	Similarity (%)
Catalytic activity					
CNBG_5689	XP_567571	glutamate synthase (NADH)	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	0	96
CNBG_1228	XP_566910	purine nucleotide biosynthesis - related protein	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	0	99
CNBG_2961	XP_567751	cytochrome c oxidase subunit V	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	7.21919E-48	95
CNBG_5233	XP_571137	isoprenoid biosynthesis -related protein	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	0	98
CNBG_5871	AAN75183	LPD1	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	0	99
CNBG_5891	XP_570096	histone deacetylation -related protein	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	0	76
Binding					
CNBG_1506	XP_566725	actin filament organization - related protein	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	3.41261E-59	95
CNBG_2009	XP_571615	nonhistone protein 6	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	3.93639E-28	86
CNBG_2725	XP_572710	SCP160 protein	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	0	97
CNBG_2986	XP_567894	protein binding protein	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	3.9348E-123	94
CNBG_3210	XP_567624	endocytosis-related protein	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	0	85
CNBG_5866	Q5Y223	electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	<i>C. bacillisporus</i>	2.1543E-158	98
CNBG_4946	XP_568254	translational initiation -related protein	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	0	97
CNBG_5765	XP_567951	14-3-3 protein	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	5.1547E-136	100
CNBG_0239	XP_566757	heat shock protein	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	0	99
CNBG_3266	XP_569509	heat shock protein 70	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	0	99
CNBG_4499	XP_567978	heat shock protein	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	0	99
CNBG_4857	AAN76524	heat-shock protein 90	<i>C. bacillisporus</i>	0	99
CNBG_4912	XP_568283	heat shock protein	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	0	96
CNBG_5017	XP_568652	heat shock protein	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	1.7379E-117	98
CNBG_5573	XP_569211	heat shock protein	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	0	99
CNBG_5853	AAS92524	HSP12	<i>C. bacillisporus</i>	7.09732E-30	95
CNBG_5963	XP_570059	heat shock protein HSP60	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	0	98
Structural constituent of ribosome					
CNBG_3655	XP_569366	PRCDNA38	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	1.69873E-40	98
CNBG_1225	XP_566913	PRCDNA87	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	1.67055E-66	100
CNBG_2105	XP_571814	structural constituent of ribosome	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	4.53609E-41	99
CNBG_5635	XP_567521	ribosomal protein	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	1.27402E-63	99
Miscellaneous					
CNBG_3046	XP_567711	nucleus protein	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	0	96
CNBG_0575	XP_570348	meiotic recombination -related protein	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	0	97
CNBG_5197	XP_571006	mRNA polyadenylation -related protein	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	0	95

Table 2. Upregulated proteins after growth of *C. gattii* in LIM, in comparison to cultivation of the fungus in LIM+Fe. Proteins listed in this table were found to be statistically differentially expressed ($p < 0.01$) and have an absolute fold change greater than 2.5. The set of proteins also satisfies the BH-FDR of 0.05 criterion.

BROAD Institute ID Protein name	Fold Change*
Catalytic activity	
<i>hydrolase activity</i>	
CNBG_2780 peptidase (403 aa)	7.2
CNBG_6001 extracellular elastolytic metalloproteinase (814 aa)	6.7
CNBG_0785 6-phosphogluconolactonase (295 aa)	5.6
CNBG_3720 beta-1,4-glucosidase (422 aa)	3.1
<i>oxidoreductase activity</i>	
CNBG_5787 glucose-methanol-choline oxidoreductase (589 aa)	6.9
CNBG_1866 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (337 aa)	2.7
CNBG_5326 D-lactaldehyde dehydrogenase (347 aa)	3.8
CNBG_4706 UDP-glucose dehydrogenase (447 aa)	2.9
CNBG_6205 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (293 aa)	3.6
Transcription regulator activity	
CNBG_3163 wos2 protein (226 aa)	3.5
Hypothetical	
CNBG_3266 conserved hypothetical protein (641 aa)	2.6
CNBG_0780 conserved hypothetical protein (306 aa)	4.6

*Based on spectral count numbers obtained from LIM and LIM+Fe.

Table 3. Upregulated proteins after growth of *C. gattii* in LIM+Fe, in comparison to cultivation of the fungus in LIM. Proteins listed here were found to be statistically differentially expressed ($p < 0.01$) and have an absolute fold change greater than 2.5. The set of proteins also satisfies the BH-FDR of 0.05 criterion.

BROAD Institute ID Protein name	Fold Change*
Catalytic activity	
<i>hydrolase activity</i>	
CNBG_1511 1,4-alpha-glucan branching enzyme (683 aa)	2.9
<i>ligase activity</i>	
CNBG_1784 acetyl-CoA carboxylase (2045 aa)	2.8
<i>lyase activity</i>	
CNBG_0705 aconitase (781 aa)	6.6
<i>oxidoreductase activity</i>	
CNBG_0069 acyl-CoA dehydrogenase (521 aa)	6.4
CNBG_5247 fatty acid synthase beta subunit (2515 aa)	5.1
CNBG_4517 ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein 2 (435 aa)	4.1
CNBG_2079 mannitol-1-phosphate dehydrogenase (421 aa)	3.6
CNBG_5912 saccharopine dehydrogenase (396 aa)	2.7
<i>transferase activity</i>	
CNBG_1012 ATP-citrate synthase (1151 aa)	4.4
CNBG_1047 glycine hydroxymethyltransferase (500 aa)	3.5
CNBG_1488 methionine adenosyltransferase (398 aa)	3.7
CNBG_6151 malate synthase (539 aa)	3.2
Binding	
<i>ion binding</i>	
CNBG_0737 centromere/microtubule-binding protein cbf5 (504 aa)	3.7
CNBG_4198 calnexin (555 aa)	4.1
<i>nucleotide binding</i>	
CNBG_5683 MMS2 protein (811 aa)	4.1
Transporter activity	
CNBG_1793 H ⁺ -transporting two-sector ATPase subunit alpha (541 aa)	7.9
<i>substrate-specific transporter activity</i>	
CNBG_1632 ATP synthase beta subunit (548 aa)	3.5
<i>transmembrane transporter activity</i>	
CNBG_3615 voltage-dependent ion-selective channel (293 aa)	17.0
Transcriptional regulator activity	
CNBG_4420 nascent polypeptide-associated complex subunit beta (176 aa)	2.8
Structural component of ribosome	
CNBG_2316 60S ribosomal protein L24 (151 aa)	3.6
CNBG_2923 40S ribosomal protein S0 (293 aa)	2.8
CNBG_1273 60S ribosomal protein L7 (251 aa)	2.6
CNBG_0793 60S ribosomal protein L18-A (191 aa)	5.7
CNBG_0179 40S ribosomal protein S16 (141 aa)	3.2
CNBG_2051 L10e protein (313 aa)	6.6
Hypothetical	
CNBG_1979 conserved hypothetical protein (188 aa)	6.2
CNBG_3648 conserved hypothetical protein (112 aa)	8.0

*Based on spectral count numbers obtained from LIM and LIM+Fe.

Table 4. Spots from two-dimensional gels (2D-GE) identified by LC-MS/MS.

Spot number	Protein ID	description (BROAD database)	Sequence Count	Spectral Count	Sequence Coverage (%)	Sequence Length	MW Exp./Theor.	pI Exp/Theor.	MudPIT analysis
			LIM/LIM+Fe	LIM/LIM+Fe	LIM/LIM+Fe				
1	CNBG_5018	luminal binding protein	2/-	83/-	4.9/-	371	~32000/40693	~4.4/4.7	+
1	CNBG_4794	DNA polymerase processivity factor	-/5	-/32	-/16.6	344	~32000/38440	~4.4/4.7	+
2	CNBG_1896	formate dehydrogenase	8/7	16/7	25.7/22.3	373	~45000/41200	~4.5/7.3	+
2	CNBG_1355	endopeptidase	10/11	250/273	20.1/18.1	432	~45000/47164	~4.5/4.9	+
2	CNBG_3287	conserved hypothetical protein	3/-	8/-	6.5/-	584	~45000/63175	~4.5/5.3	+
2	CNBG_3266	conserved hypothetical protein	-/5	-/22	-/10.9	640	~45000/69393	~4.5/5.1	+
3	CNBG_1355	endopeptidase	15/7	105/48	30.1/13.9	432	~45000/47164	~4.6/4.9	+
3	CNBG_3687	protein phosphatase type 2C	9/2	12/5	13.2/4.8	516	~45000/54570	~4.6/4.5	+ only in LIM+Fe
3	CNBG_1896	formate dehydrogenase	3/3	3/3	10.7/9.1	373	~45000/41200	~4.6/7.3	+
3	CNBG_3266	conserved hypothetical protein	4/4	4/5	8.1/9.7	640	~45000/69393	~4.6/5.1	+
3	CNBG_4764	aryl-alcohol dehydrogenase	2/2	2/6	5.4/8.4	392	~45000/44111	~4.6/6.5	+
3	CNBG_5573	conserved hypothetical protein	-/4	-/5	-/11	581	~45000/61414	~4.6/5.5	+
3	CNBG_3166	phosphogluconate dehydrogenase	-/2	-/2	-/6.5	491	~45000/53783	~4.6/6.4	+
4	CNBG_4625	pyruvate dehydrogenase e1 component beta subunit	-/2	-/2	-/6.9	407	~40000/43889	~4.8/6.5	+
4	CNBG_3287	conserved hypothetical protein	-/2	-/2	-/4.6	584	~40000/63175	~4.8/5.3	+
4	CNBG_1093	predicted protein	-/2	-/2	-/2.6	1020	~40000/107576	~4.8/4.8	+
5	CNBG_5573	conserved hypothetical protein	38/21	473/164	58.2/31.5	581	~60000/61414	~5.2/5.5	+
5	CNBG_2948	N-terminal asparagine amidohydrolase	2/-	19/-	25.9/-	108	~60000/11560	~5.2/4.5	-
5	CNBG_4706	UDP-glucose dehydrogenase	8/-	24/-	19.3/-	446	~60000/49317	~5.2/5.9	+
5	CNBG_3266	conserved hypothetical protein	8/-	13/-	14.5/-	640	~60000/69393	~5.2/5.1	+
5	CNBG_5787	glucose-methanol-choline oxidoreductase	6/2	10/3	13.3/7.3	588	~60000/65310	~5.2/6	+
5	CNBG_0239	conserved hypothetical protein	5/2	5/3	11.1/6.2	614	~60000/67116	~5.2/5.5	+
5	CNBG_4912	conserved hypothetical protein	3/2	3/4	5.7/5.7	756	~60000/83654	~5.2/5.2	+
5	CNBG_2828	phosphoenolpyruvate carboxykinase	2/-	2/-	4.7/-	551	~60000/61775	~5.2/6.4	+
5	CNBG_1093	predicted protein	2/-	2/-	2.6/-	1020	~60000/107576	~5.2/4.8	+
6	CNBG_5029	acyl-CoA oxidase	22/12	113/67	52.2/28.8	427	~45000/47035	~5.4/5.7	+
6	CNBG_1346	cAMP-dependent protein kinase inhibitor	3/-	20/-	10.6/-	482	~45000/52354	~5.4/5.2	+
6	CNBG_1185	succinyl-CoA ligase beta-chain	3/-	15/-	8.4/-	418	~45000/44897	~5.4/6.1	-
6	CNBG_3266	conserved hypothetical protein	3/-	4/-	6.1/-	640	~45000/69393	~5.4/5.1	+
6	CNBG_1816	ketol-acid reductoisomerase	3/-	8/-	5/-	401	~45000/44402	~5.4/8	+
6	CNBG_4857	conserved hypothetical protein	2/-	4/-	3.9/-	699	~45000/79302	~5.4/5	+
6	CNBG_1632	ATP synthase beta subunit	2/-	2/-	3.7/-	547	~45000/58616	~5.4/6.3	+
6	CNBG_1618	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	-/8	-/12	-/26.4	375	~45000/41037	~5.4/6.4	+

Table 4. Continued.

Spot number	Protein ID	description (BROAD database)	Sequence			Sequence Length	MW Exp./Theor.	pI Exp/Theor.	MudPIT analysis
			Count LIM/LIM+Fe	Spectral Count LIM/LIM+Fe	Coverage (%) LIM/LIM+Fe				
7	CNBG_1632	ATP synthase beta subunit	18/-	158/-	43.7/-	547	~52000/58616	~5.3/6.3	+
7	CNBG_3197	conserved hypothetical protein	5/-	12/-	14.3/-	510	~52000/54706	~5.3/6.3	+
7	CNBG_3703	phosphopyruvate hydratase	3/5	4/9	14.1/20.6	433	~52000/46369	~5.3/5.5	+
7	CNBG_2108	mitochondrial processing peptidase beta subunit	4/-	21/-	10.7/-	478	~52000/52500	~5.3/6	+
7	CNBG_5573	conserved hypothetical protein	3/-	4/-	7.7/-	581	~52000/61414	~5.3/5.5	+
7	CNBG_0239	conserved hypothetical protein	2/2	2/2	4.2/7	614	~52000/67116	~5.3/5.5	+
7	CNBG_4857	conserved hypothetical protein	2/-	4/-	3.1/-	699	~52000/79302	~5.3/5	+
7	CNBG_0779	1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase	2/-	2/-	1/-	1997	~52000/220602	~5.3/6	-
8	CNBG_3703	phosphopyruvate hydratase	21/9	384/140	45.3/28.4	433	~50000/46369	~5.7/5.5	+
8	CNBG_3166	phosphogluconate dehydrogenase	7/4	9/4	18.3/14.5	491	~50000/53783	~5.7/6.4	+
8	CNBG_2038	RAB GDP-dissociation inhibitor	4/4	7/4	11.7/12.6	452	~50000/50384	~5.7/5.6	+
8	CNBG_4857	conserved hypothetical protein	6/-	16/-	8.6/-	699	~50000/79302	~5.7/5	+
8	CNBG_4912	conserved hypothetical protein	5/-	9/-	8.3/-	756	~50000/83654	~5.7/5.2	+
8	CNBG_5562	endopeptidase	2/2	6/3	6/7.1	436	~50000/49237	~5.7/5.6	+
8	CNBG_5240	nucleosome assembly protein I	2/-	2/-	5.8/-	416	~50000/46872	~5.7/4.4	+
8	CNBG_1876	conserved hypothetical protein	2/-	14/-	5.1/-	670	~50000/73462	~5.7/6.3	-
8	CNBG_4834	translation elongation factor EF1-alpha	2/-	4/-	4.1/-	459	~50000/50303	~5.7/9	+
9	CNBG_3648	conserved hypothetical protein	4/-	147/-	28.8/-	111	~12000/12282	~6.2/6.1	+
9	CNBG_3023	ubiquitin protein 1	2/-	5/-	6.6/-	381	~12000/42776	~6.2/7.6	-
10	CNBG_2079	mannitol-1-phosphate dehydrogenase	24/12	223/68	61.2/41.9	420	~38000/44521	~6.8/8.5	+
10	CNBG_0022	conserved hypothetical protein	13/3	16/4	55.6/19.5	338	~38000/36345	~6.8/7.1	+
10	CNBG_1866	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	10/2	106/6	35.7/10.4	336	~38000/35907	~6.8/7.1	+
10	CNBG_4654	cysteine synthase	4/-	9/-	15.7/-	363	~38000/38809	~6.8/7.9	+
10	CNBG_0601	ATP phosphoribosyltransferase	3/-	11/-	14.8/-	357	~38000/37396	~6.8/6.3	+ only on LIM
10	CNBG_4593	cytoplasm protein	2/-	3/-	11.3/-	346	~38000/37147	~6.8/6.9	+
10	CNBG_4188	mannitol-1-phosphate dehydrogenase	4/3	28/37	10.8/6.9	361	~38000/37685	~6.8/7.2	+
10	CNBG_2246	phosphoglycerate kinase	2/-	3/-	7/-	417	~38000/44837	~6.8/6.7	+
10	CNBG_0705	aconitase	2/-	2/-	4.1/-	780	~38000/84864	~6.8/6.9	+

Supporting Information Available

Table S1. DTAsselect results of 12 salt-steps performed for each biological and technical replicates in for each experimental condition.

Table S2. Whole set of proteins identified by MudPIT. Proteins were present in at least 1 replicate and identified with a minimum of 2 peptides.

Table S3. GO annotation according biological process and molecular function terms. Non-hypothetical proteins were classified using Blast2GO tool.

Table S4. BLAST results and GO annotation for hypothetical proteins obtained with Blast2GO tool. In bold, hypothetical proteins which have homology with proteins known in other organisms.

Table S5. KEGG pathways based on MudPIT protein data.

Figure S1. Cell surface reductase activity displayed by R265 and H99 strains grown in LIM and LIM+Fe conditions.

Disponível pelo site: <http://omicsdatalabfimb.wordpress.com/>

5. Capitulo II:

The effect of the alterations of copper levels in the proteome of *Cryptococcus gattii*

The effect of the alterations of copper levels in the proteome of *Cryptococcus gattii*

Juliana Crestani¹, Paulo Costa Carvalho^{2,3}, Lívia Kmetzsch¹, Charley Christian Staats^{1,4}, Augusto Schrank^{1,4}, John R Yates III⁵, Marilene Henning Vainstein^{1,4*}

¹ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 43421, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brasil;

² Laboratório de Toxinologia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil;

³ Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde (CDTS), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

⁴ Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 43421, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil.

⁵ Department of Chemical Physiology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA.

*Corresponding author: Marilene Henning Vainstein

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 43421, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil.

mhv@cbiot.ufrgs.br

ABSTRACT

Copper is an essential nutrient, which is a cofactor in many proteins and redox enzymes. The redox properties of copper can also lead to the generation of free radicals; therefore, mechanisms involved in copper homeostasis are extremely regulated. *Cryptococcus gattii* is a pathogen that causes cryptococcosis in humans and animals. This fungus is responsible for an ongoing cryptococcosis outbreak in Vancouver Island, BC, Canada, with substantial mortality and morbidity. Here, we evaluated the response of *C. gattii* to the alterations of copper levels by using Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT). The results obtained demonstrated that the growth of *C. gattii* was impaired by copper availability and that proteins related to secretion and signaling pathways were affected. In addition, our results suggest that *C. gattii* copper homeostasis may be similar to the one developed by *Sacharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans* serotype A.

Keywords: *Cryptococcus gattii* R265, Proteomics, 2D-LC-MS/MS, MudPIT, copper

1. Introduction

Copper is an essential metal for living organisms. It is a redoxactive metal ion essential for most aerobic organisms, which also serves as a catalytic and structural cofactor for variety of metalloenzymes, including superoxide dismutase (antioxidant response) and cytochrome c oxidase (electron transport chain) (Banci *et al.* 2010a). It is

also involved in acquisition and transport of iron in events such as signal transduction, oxygen transport and generation of ATP through oxidative respiration. Moreover, copper is toxic because it can catalyze the generation of aggressive free radicals. Therefore, many organisms have a number of elaborate mechanisms at its disposal to control the copper homeostasis (Laloti *et al.* 2009). Copper homeostasis in fungi is maintained by the transcriptional regulation of genes involved in copper acquisition, mobilization and sequestration and also at the posttranslational level (Gross *et al.* 2000).

Metal copper is also described to enhance the virulence of bacterial, virus and fungal pathogens. For example, in *Mycobacterium tuberculosis* the resistance of copper is essential for the success of infection (Wolschendorf *et al.* 2011). In the plant pathogen *Botrytis cinerea*, null mutants for copper transporter protein ATPase BcCcc2 were avirulent in a model of infection in tomato leaf (Saitoh *et al.* 2010).

Cryptococcus neoformans is close related species of *Cryptococcus gattii*, which is responsible for an ongoing outbreak in Vancouver Island, British Columbia, Canada. There, substantial morbidity and mortality rates of humans and animals were evidenced (Kidd *et al.* 2004; Duncan *et al.* 2006b; Fyfe *et al.* 2008; Galanis & Macdougall 2010). *C. gattii* is an encapsulated yeast that causes cryptococcosis mainly in immunocompetent individuals. Cryptococcosis may be acquired by the inhalation of the airborne propagules of *C. gattii*. This disease is characterized by an initial mild pulmonary infection, which progresses to severe condition in the central nervous system (meningoencephalitis) leading to death if not treated (Chayakulkeeree & Perfect 2006). Classical virulence factors such as melanin, polysaccharide capsule, and ability to

growth at 37 °C have been well characterized in *C. gattii* and *C. neoformans* (Idnurm *et al.* 2005).

Studies involving *C. neoformans* and copper availability have already identified mechanisms involved in copper uptake and regulation showing that copper is linked to the production of virulence factors as melanin and polysaccharide capsule (Nyhus & Jacobson 2004; Walton *et al.* 2005; Waterman *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2009a; Jiang *et al.* 2009b; Chun & Madhani 2010; Zhu *et al.* 2010). For example, the cryptococcal copper-dependent transcription factor 1 (Cuf1) is involved in both, copper acquisition and copper detoxification in response to copper variation; the deletion of Cuf1 led to defects in growth and virulence factor expression in low copper conditions (Waterman *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2011). For *C. gattii*, *in silico* analysis pointed to similar proteins linked to the copper pathways previously described for *C. neoformans* and the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Silva *et al.* 2011). These analyses suggest correspondent mechanisms involved in copper homeostasis between *C. neoformans*, *S. cerevisiae* and *C. gattii*. However, further studies are required to clarify these pathways in *C. gattii*.

In the present work we used Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT) to obtain the global proteomic profile of *C. gattii* R265 strain after growth under copper depleted and replete condition. The results suggested that copper limitation is critical for cell development of this pathogen. Our comparative analysis demonstrated that copper affects diverse signaling pathways and secretion routes, which are involved in the virulence of *C. gattii*. In addition, copper homeostasis

developed by *C. gattii* seems to be similar to the one from *S. cerevisiae* and *C. neoformans* serotype A.

2. Materials and Methods

2.1. Fungal strain and growth conditions

The *C. gattii* strain R265 was previously identified by Kidd *et al.* (Kidd *et al.* 2004) and was a gift from Dr Wieland Meyer from the culture collection of Molecular Mycology Research Laboratory Westmead Hospital. The strain was grown in 10 ml of Yeast Peptone Dextrose (YPD) broth (yeast extract 1%, peptone 1% and glucose 2%) previous to a further cultivation in 100 ml of Yeast Nitrogen Base broth (YNB, Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) for 24 h. In order to evaluate the effects of copper on the global protein expression, the cells (5×10^7 cells.ml⁻¹) were transferred to 50 ml of Limited-Copper medium (LCM) and of Copper-replete medium (LCM+Cu) for 12 h as described before (Jacobson *et al.* 1998; Lian *et al.* 2005; Jung *et al.* 2006). LCM contained the same compounds of previously described low-iron medium (LIM), without addition of CuSO₄ and added of 100 µM bathocuproine disulphonate (BCS, Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA), and LCM+Cu was prepared identical of iron-replete medium (LIM+Fe) (Jacobson *et al.* 1998). All cultures were grown at 37 °C with shaking (200 rpm).

2.2 Growth curve

Cells of *C. gattii* R265 (5×10^7 cells.ml⁻¹) were inoculated in LCM, LCM+Cu, LIM and in a rich medium (YPD) and grown at 37 °C with shaking (200 rpm) during a total of 24 h. Aliquots of cells from each condition of growth were collected in the following time intervals: 4, 8, 12 and 24 h. Serial dilutions of cells from cultures (100 µl) were inoculated in plates containing YPD and grown at 30 °C during 48 h. After this period, colony forming units were determined and the results of triplicate experiments were adjusted and plotted in a graph.

2.3. Preparation of protein extracts

Cells were collected by centrifugation at 7,500 xg for 10 min, lyophilized and disrupted with mortar and pestle in liquid nitrogen to a fine powder. The samples were suspended in buffer with protease inhibitors (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 50 µM TPCK, 5 mM Iodoacetamide). Proteins were solubilized by vortexing the suspensions for 5 min, followed by centrifugation at 10,000 xg for 20 min. Supernatants were collected and reserved at -20 °C. Remaining cell debris were suspended in the same buffer, following by vortexing (5 min) and sonication (25 Hz in a VC601 Sonics and Materials Inc. sonicator) in an ice bath by three 30 sec cycles with 1 min interval. Supernatant was collected after centrifugation, pooled to the first supernatant and stored at -80 °C. Protein concentration was determined using the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA), following manufacturer's instructions.

2.4. Sample preparation and MudPIT

Approximately 100 µg *C. gattii* protein extracts were suspended in digestion buffer (8 M urea, 100 mM Tris-HCl pH 8.5). Proteins were reduced with 10 mM dithiothreitol at 37 °C during 30 min and alkylated with 15 mM iodoacetamide at room temperature in the dark for 20 min. After addition of 1 mM CaCl₂ (final concentration) the proteins were digested with 2 µg of trypsin (Promega, Madison, USA) by incubation at 37 °C during 16 h. Proteolysis was stopped by adding formic acid to a final concentration of 5%. Samples were centrifuged at 18,000 *xg* for 30 min and the supernatant was collected and stored at -20 °C. The conditions used for 2D-LC-MS/MS were as described by Washburn *et al.* (2001). The flow rate at the tip of the biphasic column was 100 nl /min when the mobile phase composition was 95% H₂O, 5% acetonitrile and 0.1% formic acid. The ion trap mass spectrometer (Finnigan LTQ-XL, Thermo, San Jose, CA) was set to the data-dependent acquisition mode with dynamic exclusion turned on. One MS survey scan was followed by nine MS/MS scans and 12 salt steps were performed. Mass spectrometer scan functions and HPLC solvent gradients were controlled by the Xcalibur data system (Thermo, San Jose, CA). Three biological replicates and three technical replicates were analyzed for both *C. gattii* R265 culture conditions (LCM and LCM+Cu).

2.5. Interpretation of MS/MS Data Sets

Tandem mass spectra were extracted from the raw files using RawExtract 1_9_3 (McDonald *et al.* 2004) and were searched with SEQUEST (Eng *et al.* 1994) against the

C. gattii R265 strain database plus common contaminant proteins. All sequences were downloaded as FASTA-formatted files from the Broad Institute protein database, released on August 5, 2009 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans_b/MultiDownloads.html). The peptide mass search tolerance was set to 3 Da. Carboxymethylation was considered as a static modification. No enzymatic cleavage conditions were imposed on the database search, so the search space included all candidate peptides, whose theoretical mass fell within the 3 Da mass tolerance window, regardless of their tryptic status. The validity of peptide/spectrum matches was assessed in DTASelect (Tabb *et al.* 2002) according to the SEQUEST cross-correlation score (XCorr) and the SEQUEST normalized difference in cross-correlation score (DeltaCN). The search results were grouped by charge state (+1, +2 and +3) and tryptic status (Fully tryptic, half-tryptic and non-tryptic), resulting in nine subgroups. In each of the subgroups, the distribution of XCorr and DeltaCN values for the direct and decoy database hits was obtained and the two subsets were separated by quadratic discriminant analysis. Outlier points in the two distributions (for example, matches with very low XCorr but very high DeltaCN) were discarded. As the full separation of the direct and decoy subsets is not generally possible, the discriminant score was set such that a false discovery rate of 1% was determined based on the number of accepted decoy database peptides. This procedure was independently performed on each data subset, resulting in a false-positive rate independent of tryptic status or charge state. In addition, a minimum sequence length of 7 amino acid residues was required, and each protein on the list was supported by at least two peptide identifications. These additional requirements,

especially the latter, resulted in the elimination of most decoy database and false-positive hits, as these tended to be overwhelmingly present as proteins identified by single peptide matches. After this last filtering step, the estimated false discovery rate was reduced to below 1%.

2.6. PatternLab for Proteomics analysis

PatternLab (Carvalho *et al.* 2008; Carvalho *et al.* 2010) was used to pinpoint differentially expressed proteins found in both biological conditions and the ones unique to each condition. First, a spectral count database (DB) was obtained by using PatternLab to parse the DTASelect files resulting from the *C. gattii* LCM and *C. gattii* LCM+Cu biological triplicates to the PatternLab's native data format (sparse matrix and index files).

PatternLab's TFold module (Carvalho *et al.* 2009) was used for selecting proteins found in both conditions that were considered as differentially expressed. The spectral counts from the DB were normalized according to the Row Sigma normalization (Carvalho *et al.* 2008). To ensure reproducibility and use of the T-Test, proteins that were not detected in at least 8 out of the 12 assays were discarded. Proteins whose average of the spectral counts had an absolute fold change greater than 2.5 and p-value of less than 0.01 according to the t-test were considered as differentially expressed. The fold change cutoff was established by iteratively increasing the cutoff as to have the p-values from all differentially expressed proteins satisfy the BH false discovery estimator criterion of 0.05 (Benjamini & Hochberg 1995).

PatternLab's Approximately Area Proportional Venn Diagram (AAPVD) module (Fischer Jde *et al.* 2010) was used for pinpointing proteins uniquely identified in one condition. For each biological condition, proteins identified in only one out of the three replicates were discarded.

2.7. Gene Ontology (GO) annotation

The Blast2GO tool (<http://www.blast2go.org>) was used to obtain functional categories of proteins (Conesa *et al.* 2005; Gotz *et al.* 2008). This tool assigns the Gene Ontology (GO) terms based on the BLAST definitions. First, the lists of proteins identified were converted in a FASTA file and submitted to Blast2GO platform, where they were compared against NCBI databases (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/staff/tao/URLAPI/remote_blastdblist.html) to find sequences similar to query set submitted. BlastP was used to identify homologous proteins in the database, and default parameters in Blast2GO were used for GO term assignment and annotation. The data generated by the Blast2GO analysis were represented at level 2, 3 and at multilevels, illustrating the general functional categories according molecular functions.

2.8. Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) analysis

The STRING tool [version 8.3 – January 2011] (Snel *et al.* 2000) was used to analyze the interactions, including direct (physical) and indirect (functional) associations, of

specific proteins identified. All searches were developed by protein sequence and the default parameters were used.

2.9. Western blot

For western blots, 20 µg of *C. gattii* proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (37 kDa) was detected with polyclonal antisera against the recombinant GAPDH from *Paracoccidioides brasiliensis* (Barbosa *et al.* 2006). Protein expression levels were quantified with the ImageJ software (NIH, Maryland, USA).

3. Results

3.1. Copper deprivation dramatically affects the growth of *C. gattii*

We initially investigated the growth of *C. gattii* under copper depleted condition (LCM) compared to: a copper replete (LCM+Cu), an iron starvation (LIM) and a rich nutrient condition (YPD). As shown in Fig. 1, under copper deprivation, *C. gattii* maintain a constant number of viable cells during 24 h of cultivation, which was not observed using other media of cultivation. This data demonstrates that availability of copper dramatically affect the normal growth of this pathogen.

The results obtained were used to define a better time of cultivation of *C. gattii* under copper-depleted and replete conditions for the development of the proteomic analysis.

3.2. Global proteomic analysis

The global proteomic analysis was performed from *C. gattii* cells grown during 12 h in LCM or LCM+Cu. Using a high throughput MudPIT approach, from three biological and three technical replicates, 544 and 1288 total proteins were identified from *C. gattii* grown in LCM and LCM+Cu conditions, respectively (Table S1). The reproducibility and overlap between the three biological replicates of the proteins obtained from LCM and LCM+Cu are evidenced on Fig S1. About 42% less proteins were expressed by *C. gattii* after growth under copper deprivation showing that the protein abundance is dramatically impaired by low copper availability in *C. gattii*.

3.3. Functional classification of the proteins identified

To evaluate the functions affected by fluctuations of copper levels in *C. gattii*, the gene ontology (GO) terms according molecular functions were accessed. GO classification was performed in all proteins identified at least in 2 distinct replicates from LCM (484 proteins) and LCM+Cu (917 proteins), including hypothetical proteins (Table S2).

The Fig. 2 represents the multilevel GO classification of *C. gattii* proteins identified commonly from LCM and LCM+Cu (478 proteins). Proteins related to ATP

binding (72 proteins) category were the majority in this analysis; such was expected because of the roles developed by these proteins in the regulation of metabolic processes. We highlight two interesting categories from the GO analysis: the iron ion binding (10 proteins) and the zinc ion binding (18 proteins). Studies about copper, iron, and zinc homeostasis demonstrated connections among them in other models (Kozłowski *et al.* 2009; Palmer & Guerinot 2009) and our results suggest similar connections in *C. gattii*. We also observed proteins assigned to RNA binding (21 proteins), which is a class of proteins commonly involved in post-transcriptional regulation. These proteins may act in the regulation of cellular homeostasis in this fungus.

Some molecular functions were exclusively observed in proteins of *C. gattii* identified only after grown in LCM+Cu, such as DNA damaged response, transcription regulation, heme-copper oxidase activity, oxidoreductase activities, biosynthesis of aminoacyl-tRNA, peptidase activities, ion channel activities among others (Table S3). Two proteins related to MAPK signalling pathway were uniquely identified after growth of the fungus in LCM+Cu condition (CNBG_3782 cdk1 protein kinase, CNBG_3912 mitogen-activated protein kinase HOG1). These proteins are involved in the conserved high-osmolarity glycerol (HOG) pathway that is enrolled in response to osmotic stress in *C. neoformans* (Cruz *et al.* 2000). Proteins linked to other signalling pathways were also evidenced after growth of *C. gattii* in LCM+Cu (CNBG_1346 cAMP-dependent protein kinase inhibitor, CNBG_3879 calmodulin, CNBG_6111 glycogen synthase kinase 3), suggesting that copper sensing may be coordinated by diverse signaling cascades in *C. gattii* (Table S3).

3.4. Comparative proteomic analysis

The quantitative analysis of protein expression revealed a total of 43 differentially expressed proteins, of which 4 proteins were upregulated and 39 proteins were downregulated in comparison to proteins obtained after fungus grown in LCM *versus* LCM+Cu (Table1). The GAPDH expression was used as a prototype for experimental validation of differential expression proteomic results by a western blot assay (Fig. 3).

Two proteins, the protein vacuolar-sorting protein SNF7 (CNBG_3856) and the hypothetical protein, CNBG_4901, were 15.1-fold and 10.6-fold upregulated in *C. gattii* after LCM cultivation, compared to LCM+Cu, respectively. A systematic analysis using STRING tool evidenced the relationship of these proteins with others proteins linked to secretion pathways in *C. neoformans* (Fig. 4). SNF7 is also required for the proteolytic cleavage of the transcription factor RIM101, a pH responsive transcription factor (Fig. 4A). Sequence analysis revealed that the hypothetical protein CNBG_4901 has homology with a protein known in other organisms as belonging to t-SNARE complex (Fig. 4B). The t-SNARE proteins are involved in vesicle fusion, which is the exocytosis of cellular transport vesicles with the cell membrane. These results suggest that the fluctuations of the levels of this metal may result in activation of signaling and secretion pathways in this pathogen.

Another upregulated protein between LCM and LCM+Cu, was a cyclophilin A (3.2-fold), which is involved in the Ca^{2+} -calcineurin signaling pathway (Table 1). The cyclophilins have a diverse array of additional cellular functions, including roles as

chaperones and in cell signaling (Wang & Heitman 2005). Studies in *C. neoformans* demonstrated that the cyclophilin A is required for growth in high temperature and full virulence of this fungus (Wang *et al.* 2001).

The majority of proteins selected in the comparative analysis were downregulated after grown of *C. gattii* under LCM when compared to LCM+Cu (Table 1). Some of these proteins were related to metabolic pathways such as amino acid metabolism (S-adenosylhomocysteine hydrolase, aryl-alcohol dehydrogenase, saccharopine dehydrogenase), fatty acid metabolism (fatty acid synthase complex protein, acyl-CoA oxidase, 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase), glycolysis/gluconeogenesis (glucose-6-phosphate isomerase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), TCA cycle (pyruvate carboxylase, aspartate transaminase), pentose phosphate pathway (transaldolase) and aminoacyl t-RNA biosynthesis (alanine-tRNA ligase, leucine-tRNA ligase, glycine-tRNA ligase). These metabolic responses suggest that their regulation may be connected to availability of copper in *C. gattii*.

Proteins linked to assembly of ribosome were also downregulated in the comparison to proteins identified from LCM *versus* LCM+Cu; this suggests that the protein biosynthesis may be influenced by copper in this pathogen.

3.5. Copper homeostasis in *C. gattii*

A search in our *C. gattii* proteomic data against proteins described on published data from Silva and colleagues (2011) about orthologs related to iron/ copper and zinc

homeostasis was developed (Silva *et al.* 2011). As demonstrated on Table 2, four proteins related to iron homeostasis (CNBG_4942, CNBG_4943, CNBG_4540, CNBG_4670) were identified in our copper data, which was expected due connections between copper and iron homeostasis. Three other proteins (CNBG_4136, CNBG_0599, CNBG_2661) identified in our proteomic copper data were described as orthologs of proteins involved in copper distribution in *S. cerevisiae* (Silva *et al.* 2011). A general transcriptional repressor *tup1* (CNBG_5300), described as implicated in iron and copper homeostasis in *C. neoformans* serotype A (Lee *et al.* 2009), was also found in our proteomic data. Altogether, the results suggest a similar mechanism to maintain copper homeostasis among *S. cerevisiae*, *C. neoformans* serotype A and *C. gattii* (Fig. 5).

4. Discussion

Copper is a transition metal essential for a broad range of enzymes. This metal is involved in many indispensable functions for cell life. For example, proteins copper-dependent, such as cytochrome c oxidase exerts a critical role in cellular survival and embryonic development in human cells (Hamza & Gitlin 2002). In *S. cerevisiae*, copper and iron homeostasis are limiting factors for growth under alkaline pH conditions (Serrano *et al.* 2004). A mitochondrial copper chaperone HCC1 is essential for embryonic development of *Arabidopsis*, possibly due to its role in cytochrome c oxidase assembly (Steinebrunner *et al.* 2011). These studies and others confirm that copper

homeostasis is necessary for a normal development of these organisms. In this context, it was evaluated the growth of *C. gattii* under copper depleted and replete conditions. The results obtained by CFU determination demonstrated that cell growth of *C. gattii* under copper starvation was affected (Fig. 1). Curiously, global proteomic analysis revealed about 42 % less proteins identified from *C. gattii* grown in LCM compared to LCM+Cu. These results suggest that copper deprivation dramatically affect protein abundance in *C. gattii*, which may result in a delay of cell growth.

Cells respond to extracellular signals through a variety of different, but often interacting, signal transduction pathways and the metals can influence these responses. For example, the zinc metal can alter cell behaviour by interacting with transcription factors and transduction molecules, mainly zinc-dependent molecules (DeMoor & Koropatnick 2000). Others metals, including arsenic, chromium, nickel, beryllium, cobalt, iron and copper, have been shown to affect growth factor receptors, G-proteins, MAPK proteins and transcription factors in human cells, however the mechanisms utilized are poorly understood (Harris & Shi 2003). In our study, it was observed that the majority of proteins related to different signaling pathways (MAPK, Ca²⁺-calcineurin, PKA/cAMP) were expressed after *C. gattii* growth under copper depleted and replete conditions. These results led us to speculate that copper homeostasis may be coordinated by multiple signaling pathways in this fungus and that copper ions might be interacting with molecules involved in transduction signals. In *C. neoformans*, signaling pathways mediate many responses, including the control of virulence factors, however as far as we known, there are no evidence about connections between copper and cell signaling in this pathogen (Kozubowski *et al.* 2009).

Copper homeostasis is critical because of the copper redox properties. Therefore, the mechanisms involved in copper homeostasis are extremely regulated; on average, less than one atom per cell of free copper was found in *S. cerevisiae* (Rae *et al.* 1999). In eukaryotic cells, it was demonstrated that these mechanisms usually involve the membrane transport and the vesicle trafficking. It is well-known that after entry of copper ions in the cell, they are stored into vacuoles for further delivery to other cellular components (Rees & Thiele 2007). Eide and colleagues (2005) developed an ionic study where, by using inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES), they assayed 4,385 mutant strains for the accumulation of 13 elements (calcium, cobalt, copper, iron, potassium, magnesium, manganese, nickel, phosphorus, selenium, sodium, sulfur, and zinc) (Eide *et al.* 2005). They revealed that copper ions were accumulated in several mutants defective in vacuolar assembly and acidification (Eide *et al.* 2005). Other studies demonstrated that many mutants in vacuolar protein sorting proteins were affected in copper homeostasis (Szczypka *et al.* 1997; van Bakel *et al.* 2005). In this way, we observed in our study that two proteins, the vacuolar-sorting protein SNF7 (CNBG_3856) and the hypothetical protein CNBG_4901, were more expressed in *C. gattii* under copper deprivation when compared to a copper replete condition (Table 1). SNF7 is linked to protein sorting resulting in the entry of these proteins into vesicles of the multivesicular body (MVB); and CNBG_4901 is probably involved in vesicle fusion with target membranes (SNARE). Altogether, our results suggest a possible role of secretion pathways in the copper homeostasis in *C. gattii*, which is also described in the fungal model *S. cerevisiae*.

In *S. cerevisiae*, the machinery responsible to maintain the copper homeostasis is well-defined. The reduction of Cu(II) to Cu(I) is performed by metalloreductases (Fre1, Fre2), and its uptake is further developed by the high-affinity (Ctr1, Ctr3) and low affinity (Fet4, Smf1) systems (Georgatsou *et al.* 1997; Pena *et al.* 1999; Pena *et al.* 2000; Kim *et al.* 2008). Inside the cell, copper may be stored in the vacuole (Ctr2), which is delivered to cytoplasm under low copper conditions (Rees *et al.* 2004; Rees & Thiele 2007). Copper chaperones (Atx1, CCS) perform the internal transport of copper to the secretion compartments, to the mitochondrion, or to cytosolic proteins (Ccc2, Sod1, Sod2) (Pufahl *et al.* 1997; Schmidt *et al.* 1999; Arnesano *et al.* 2001). The regulation of copper homeostasis at transcriptional level is developed by two distinct transcription factors, Mac1 and Ace1 (Gralla *et al.* 1991; Labbe *et al.* 1997; Rutherford & Bird 2004). In addition, to keep the homeostasis under copper replete conditions, *S. cerevisiae* has the metallothioneins proteins, which acts as metal scavengers/metal storage proteins (Cup1, Crs5) (Palmiter 1998). It has been suggested that copper distribution in *Cryptococcus* species occurs as described in *S. cerevisiae*. Through sequence comparison, it was shown that, for *C. neoformans* serotype A, the majority of genes previously described for copper homeostasis in *S. cerevisiae*, were found in the genome of this pathogen and some of them were previously studied such as Cuf1, Ctr4, Ctr2, Ccc2, Atx1, Sod1 and Tup1 (Narasipura *et al.* 2003; Walton *et al.* 2005; Waterman *et al.* 2007; Lee *et al.* 2009; Chun & Madhani 2010; Silva *et al.* 2011). In our proteomic results from *C. gattii*, four proteins (Atx1, Sod1, Sod2, Tup1) previously described as related to copper homeostasis in *S. cerevisiae* and *C. neoformans* serotype A were identified (Table 2). Although many other proteins involved in copper homeostasis were

not identified in *C. gattii*, our findings suggest a similar copper homeostasis network between *S. cerevisiae*, *C. neoformans* serotype A and *C. gattii* (Fig. 5).

C. neoformans and *C. gattii* species share major determinants of virulence as the melanin, the polysaccharide capsule, and the growth of host temperature. For *C. neoformans*, it has been described that copper homeostasis is involved in melanin production and capsule biosynthesis (Jiang *et al.* 2009a; Jiang *et al.* 2009b; Chun & Madhani 2010). Although in our results no link was found among expression of classical virulence factors and copper homeostasis in *C. gattii*, the existence of similar proteins related to copper homeostasis between *C. gattii* and *C. neoformans* suggest that these connections may also occur in *C. gattii*.

In summary, this study performed a global proteomic analysis by MudPIT to evaluate the response of *C. gattii* to copper depleted and replete conditions. This analysis allowed clarifying some functions developed by *C. gattii* to tolerate fluctuations in copper levels, such as secretion and signaling pathways, which were previously described for other organisms. However, more studies are necessary to identify the specific molecules employed by *C. gattii* in these mechanisms to maintain the copper homeostasis in these conditions.

Acknowledgements

This work was supported by Brazilian Grants from CNPq, CAPES and MCT/FINEP/Rede GENOPROT (grant number 01.07.0552.00) and by NIH P41-RR011823. PCC was funded by CAPES-Fiocruz 30/2006 and PDTIS. JC is a Ph.D.

student at Centro de Biotecnologia (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil) and received a scholarship (grant number 201227/2009-6) for a 6 months stay at The Scripps Research Institute, USA.

References

- Arnesano F., Banci L., Bertini I., Cantini F., Ciofi-Baffoni S., Huffman D.L. & O'Halloran T.V. (2001). Characterization of the binding interface between the copper chaperone Atx1 and the first cytosolic domain of Ccc2 ATPase. In: *J Biol Chem United States*, pp. 41365-76.
- Banci L., Bertini I., Cantini F. & Ciofi-Baffoni S. (2010). Cellular copper distribution: a mechanistic systems biology approach. *Cell Mol Life Sci*, 67, 2563-89.
- Barbosa M.S., Bao S.N., Andreotti P.F., de Faria F.P., Felipe M.S., dos Santos Feitosa L., Mendes-Giannini M.J. & Soares C.M. (2006). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. In: *Infect Immun United States*, pp. 382-9.
- Benjamini Y. & Hochberg Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B*, 57, 289-300.
- Carvalho P.C., Fischer J.S., Chen E.I., Domont G.B., Carvalho M.G., Degraeve W.M., Yates J.R. & Barbosa V.C. (2009). GO Explorer: A gene-ontology tool to aid in the interpretation of shotgun proteomics data. *Proteome Sci*, 7, 6.
- Carvalho P.C., Fischer J.S., Chen E.I., Yates J.R., 3rd & Barbosa V.C. (2008). PatternLab for proteomics: a tool for differential shotgun proteomics. In: *BMC Bioinformatics England*, p. 316.
- Carvalho P.C., Yates J.R. & Barbosa V.C. (2010). Analyzing shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics. *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 13, Unit 13.13.1-15.
- Chayakulkeeree M. & Perfect J.R. (2006). Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*, 20, 507-44, v-vi.
- Chun C.D. & Madhani H.D. (2010). Ctr2 links copper homeostasis to polysaccharide capsule formation and phagocytosis inhibition in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*, 5.
- Conesa A., Gotz S., Garcia-Gomez J.M., Terol J., Talon M. & Robles M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. In: *Bioinformatics England*, pp. 3674-6.
- Cruz M.C., Sia R.A., Olson M., Cox G.M. & Heitman J. (2000). Comparison of the roles of calcineurin in physiology and virulence in serotype D and serotype A strains of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 68, 982-5.

- DeMoor J.M. & Koropatnick D.J. (2000). Metals and cellular signaling in mammalian cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 46, 367-81.
- Duncan C.G., Stephen C. & Campbell J. (2006). Evaluation of risk factors for *Cryptococcus gattii* infection in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*, 228, 377-82.
- Eide D.J., Clark S., Nair T.M., Gehl M., Gribskov M., Guerinot M.L. & Harper J.F. (2005). Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol*, 6, R77.
- Eng J., McCormack A. & Yates JR. r. (1994). An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 5, 976-989.
- Fischer Jde S., Liao L., Carvalho P.C., Barbosa V.C., Domont G.B., Carvalho Mda G. & Yates J.R., 3rd (2010). Dynamic proteomic overview of glioblastoma cells (A172) exposed to perillyl alcohol. In: *J Proteomics*. 2010 Elsevier B.V Netherlands, pp. 1018-27.
- Fyfe M., MacDougall L., Romney M., Starr M., Pearce M., Mak S., Mithani S. & Kibsey P. (2008). *Cryptococcus gattii* infections on Vancouver Island, British Columbia, Canada: emergence of a tropical fungus in a temperate environment. *Can Commun Dis Rep*, 34, 1-12.
- Galanis E. & Macdougall L. (2010). Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. *Emerg Infect Dis*, 16, 251-7.
- Georgatsou E., Mavrogiannis L.A., Fragiadakis G.S. & Alexandraki D. (1997). The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J Biol Chem*, 272, 13786-92.
- Gotz S., Garcia-Gomez J.M., Terol J., Williams T.D., Nagaraj S.H., Nueda M.J., Robles M., Talon M., Dopazo J. & Conesa A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. In: *Nucleic Acids Res England*, pp. 3420-35.
- Gralla E.B., Thiele D.J., Silar P. & Valentine J.S. (1991). ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 8558-62.
- Gross C., Kelleher M., Iyer V.R., Brown P.O. & Winge D.R. (2000). Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *J Biol Chem*, 275, 32310-6.
- Hamza I. & Gitlin J.D. (2002). Copper chaperones for cytochrome c oxidase and human disease. *J Bioenerg Biomembr*, 34, 381-8.
- Harris G.K. & Shi X. (2003). Signaling by carcinogenic metals and metal-induced reactive oxygen species. In: *Mutat Res Netherlands*, pp. 183-200.
- Idnurm A., Bahn Y.S., Nielsen K., Lin X., Fraser J.A. & Heitman J. (2005). Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol*, 3, 753-64.
- Jacobson E.S., Goodner A.P. & Nyhus K.J. (1998). Ferrous iron uptake in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 66, 4169-75.

- Jiang N., Liu X., Pan J., Wang Y. & Zhu X. (2009a). Effect of the copper-responsive factor Cuf1 on the capsule biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 49, 1459-64.
- Jiang N., Liu X., Yang J., Li Z., Pan J. & Zhu X. (2011). Regulation of copper homeostasis by Cuf1 associates with its subcellular localization in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* H99. *FEMS Yeast Res.*
- Jiang N., Sun N., Xiao D., Pan J., Wang Y. & Zhu X. (2009b). A copper-responsive factor gene CUF1 is required for copper induction of laccase in *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Lett*, 296, 84-90.
- Jung W.H., Sham A., White R. & Kronstad J.W. (2006). Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biol*, 4, e410.
- Kidd S.E., Hagen F., Tschärke R.L., Huynh M., Bartlett K.H., Fyfe M., Macdougall L., Boekhout T., Kwon-Chung K.J. & Meyer W. (2004). A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 17258-63.
- Kim B.E., Nevitt T. & Thiele D.J. (2008). Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. In: *Nat Chem Biol* United States, pp. 176-85.
- Kozłowski H., Janicka-Kłos A., Brasun J., Gaggelli E., Valensin D. & Valensin G. (2009). Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation). *Coordination Chemistry Reviews*, 253, 2665-2685.
- Kozubowski L., Lee S.C. & Heitman J. (2009). Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. In: *Cell Microbiol* England, pp. 370-80.
- Labbe S., Zhu Z. & Thiele D.J. (1997). Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J Biol Chem*, 272, 15951-8.
- Laloti V., Muruais G., Tsuchiya Y., Pulido D. & Sandoval I.V. (2009). Molecular mechanisms of copper homeostasis. In: *Front Biosci* United States, pp. 4878-903.
- Lee H., Chang Y.C., Varma A. & Kwon-Chung K.J. (2009). Regulatory diversity of TUP1 in *Cryptococcus neoformans*. In: *Eukaryot Cell* United States, pp. 1901-8.
- Lian T., Simmer M.I., D'Souza C.A., Steen B.R., Zuyderduyn S.D., Jones S.J., Marra M.A. & Kronstad J.W. (2005). Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, 55, 1452-72.
- McDonald W.H., Tabb D.L., Sadygov R.G., MacCoss M.J., Venable J., Graumann J., Johnson J.R., Cociorva D. & Yates J.R. (2004). MS1, MS2, and SQT-three unified, compact, and easily parsed file formats for the storage of shotgun proteomic spectra and identifications. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 18, 2162-8.
- Narasipura S.D., Ault J.G., Behr M.J., Chaturvedi V. & Chaturvedi S. (2003). Characterization of Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: role in biology and virulence. *Mol Microbiol*, 47, 1681-94.
- Nyhus K. & Jacobson E.S. (2004). Oxy2 as a transcriptional activator gene for copper uptake in *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol*, 42, 325-31.

- Palmer C.M. & Guerinot M.L. (2009). Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat Chem Biol*, 5, 333-340.
- Palmiter R.D. (1998). The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 8428-30.
- Pena M.M., Lee J. & Thiele D.J. (1999). A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr*, 129, 1251-60.
- Pena M.M., Puig S. & Thiele D.J. (2000). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J Biol Chem*, 275, 33244-51.
- Pufahl R.A., Singer C.P., Peariso K.L., Lin S.J., Schmidt P.J., Fahrni C.J., Culotta V.C., Penner-Hahn J.E. & O'Halloran T.V. (1997). Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science*, 278, 853-6.
- Rae T.D., Schmidt P.J., Pufahl R.A., Culotta V.C. & O'Halloran T.V. (1999). Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, 284, 805-8.
- Rees E.M., Lee J. & Thiele D.J. (2004). Mobilization of intracellular copper stores by the ctr2 vacuolar copper transporter. In: *J Biol Chem United States*, pp. 54221-9.
- Rees E.M. & Thiele D.J. (2007). Identification of a vacuole-associated metalloreductase and its role in Ctr2-mediated intracellular copper mobilization. In: *J Biol Chem United States*, pp. 21629-38.
- Rutherford J.C. & Bird A.J. (2004). Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell*, 3, 1-13.
- Saitoh Y., Izumitsu K., Morita A. & Tanaka C. (2010). A copper-transporting ATPase BcCCC2 is necessary for pathogenicity of *Botrytis cinerea*. *Mol Genet Genomics*, 284, 33-43.
- Schmidt P.J., Ramos-Gomez M. & Culotta V.C. (1999). A gain of superoxide dismutase (SOD) activity obtained with CCS, the copper metallochaperone for SOD1. *J Biol Chem*, 274, 36952-6.
- Serrano R., Bernal D., Simon E. & Arino J. (2004). Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. In: *J Biol Chem United States*, pp. 19698-704.
- Silva M., Schrank A., Bailão E.F., Bailão A.M., Borges C.L., Staats C.C., Parente J.A., Pereira M., Salem-Izacc S.M., Mendes-Giannini M.J.S., Zancopé-Oliveira R.M., Rosa e Silva L.K., Nosanchuk J.D., Vainstein M.H. & Soares C.M. (2011). The homeostasis of iron, copper and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii*: A comparative analysis. *Frontiers in Microbiology*, 2, 1 - 15.
- Snel B., Lehmann G., Bork P. & Huynen M.A. (2000). STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Res*, 28, 3442-4.
- Steinebrunner I., Landschreiber M., Krause-Buchholz U., Teichmann J. & Rodel G. (2011). HCC1, the Arabidopsis homologue of the yeast mitochondrial copper chaperone SCO1, is essential for embryonic development. In: *J Exp Bot England*, pp. 319-30.
- Szczyпка M.S., Zhu Z., Silar P. & Thiele D.J. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* mutants altered in vacuole function are defective in copper detoxification and iron-responsive gene transcription. In: *Yeast England*, pp. 1423-35.

- Tabb D.L., McDonald W.H. & Yates J.R., 3rd (2002). DTASelect and Contrast: tools for assembling and comparing protein identifications from shotgun proteomics. *J Proteome Res*, 1, 21-6.
- van Bakel H., Strengman E., Wijmenga C. & Holstege F.C. (2005). Gene expression profiling and phenotype analyses of *S. cerevisiae* in response to changing copper reveals six genes with new roles in copper and iron metabolism. In: *Physiol Genomics* United States, pp. 356-67.
- Walton F.J., Idnurm A. & Heitman J. (2005). Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. In: *Mol Microbiol* England, pp. 1381-96.
- Wang P., Cardenas M.E., Cox G.M., Perfect J.R. & Heitman J. (2001). Two cyclophilin A homologs with shared and distinct functions important for growth and virulence of *Cryptococcus neoformans*. In: *EMBO Rep* England, pp. 511-8.
- Wang P. & Heitman J. (2005). The cyclophilins. *Genome Biol*, 6, 226.
- Waterman S.R., Hacham M., Hu G., Zhu X., Park Y.D., Shin S., Panepinto J., Valyi-Nagy T., Beam C., Husain S., Singh N. & Williamson P.R. (2007). Role of a CUF1/CTR4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest*, 117, 794-802.
- Wolschendorf F., Ackart D., Shrestha T.B., Hascall-Dove L., Nolan S., Lamichhane G., Wang Y., Bossmann S.H., Basaraba R.J. & Niederweis M. (2011). Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* United States, pp. 1621-6.
- Zhu C., Jiang N., Xiao D., Pan J. & Zhu X. (2010). Chloride channel-dependent copper acquisition of laccase in the basidiomycetous fungus *Cryptococcus neoformans*. *Sci China Life Sci*, 53, 125-30.

Figures and Tables

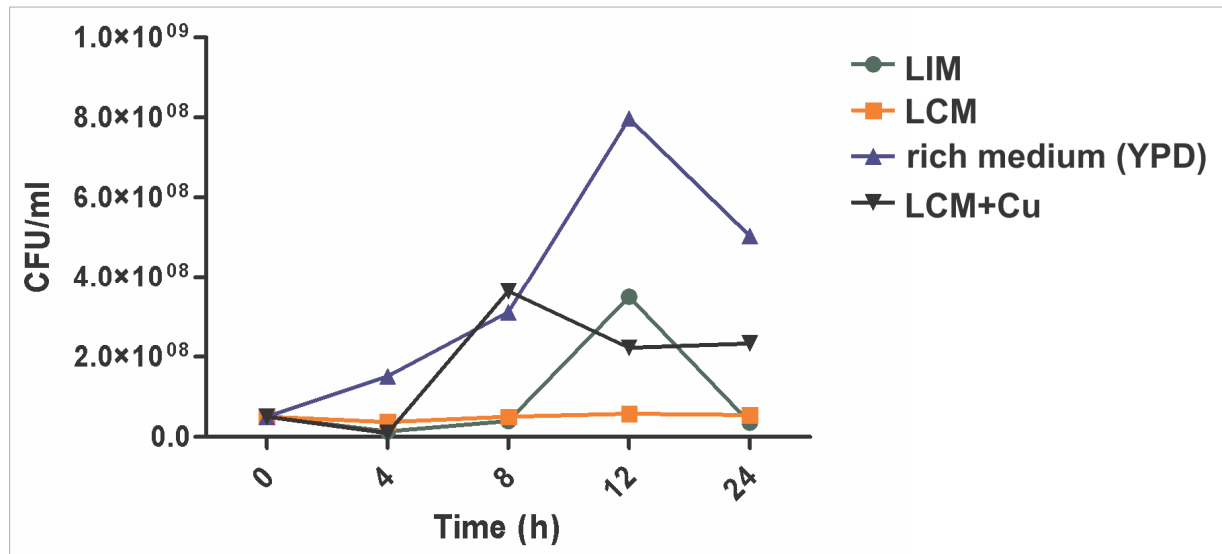


Fig. 1. Growth curve of *C. gattii* cells grown during 24h in copper depleted (LCM), copper replete (LCM+Cu), iron depleted (LIM) and in a rich medium (YPD). The CFU determination was performed after 4h, 8h, 12h and 24h of cultivation.

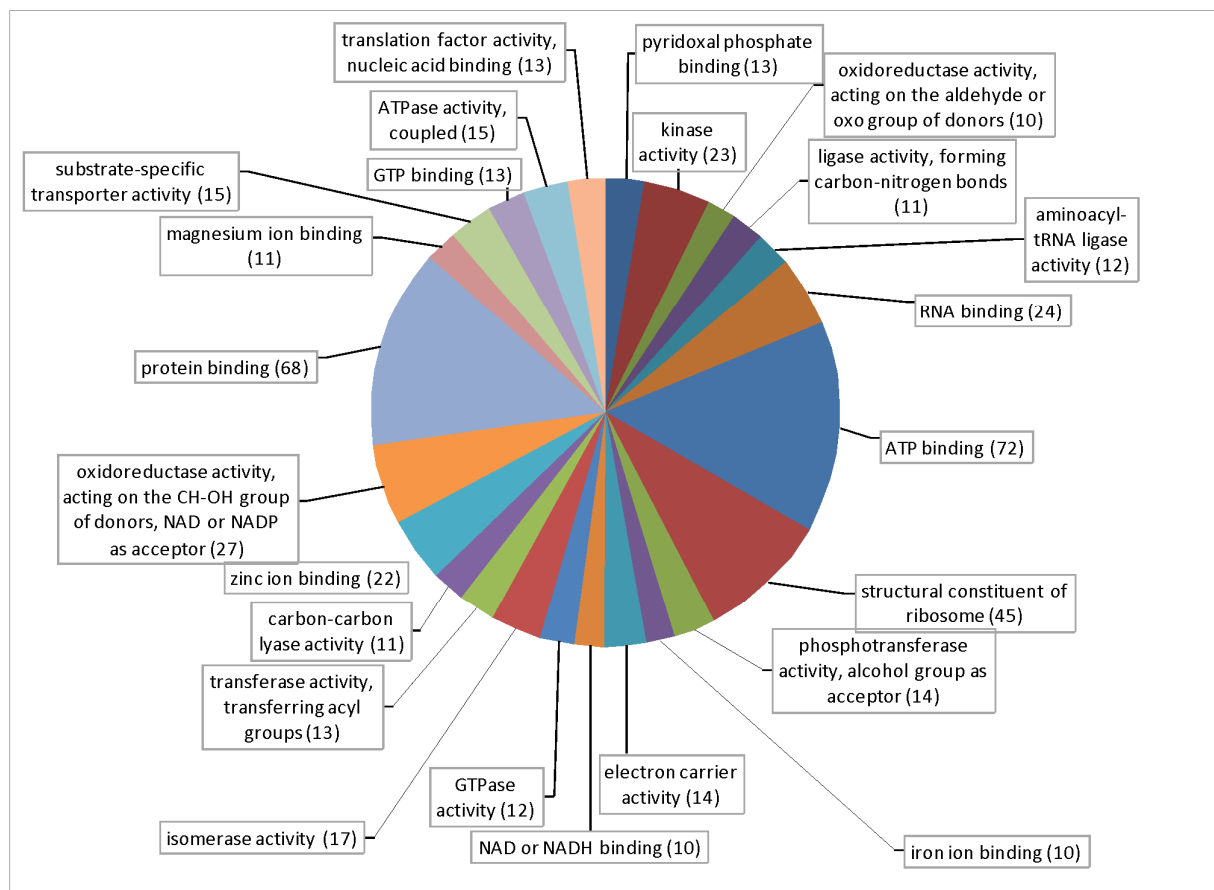


Fig. 2. GO annotation. Molecular functions are represented at multilevel, using a cutoff of 10 sequences, for proteins obtained from LCM and LCM+Cu conditions.

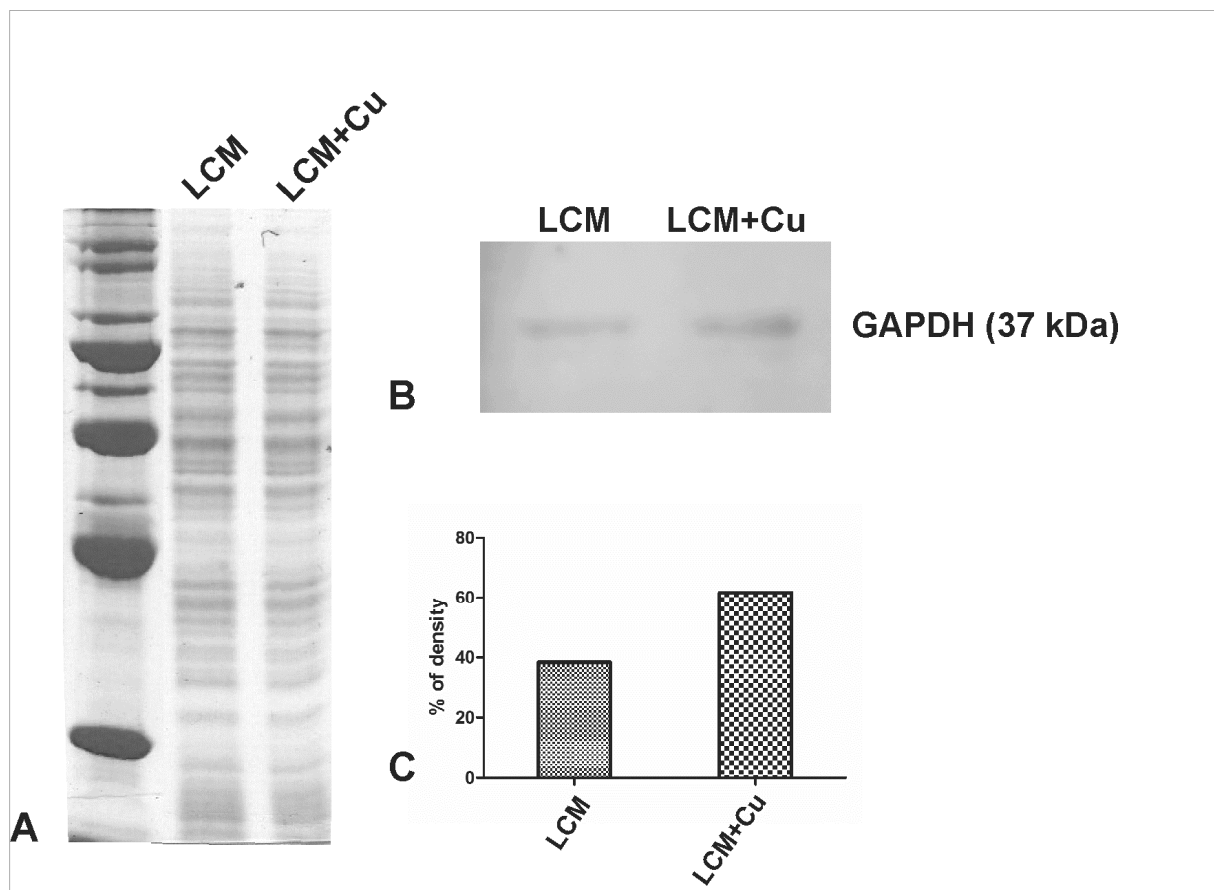


Fig. 3. GAPDH expression under copper deprivation or availability to *C. gattii* cells, determined by western blotting. Total proteins from *C. gattii* were separated in a SDS-PAGE (A) and transferred to a PVDF membrane. GAPDH protein was detected using a polyclonal antibody anti-GAPDH (B). The image was quantified by using ImageJ software (C).

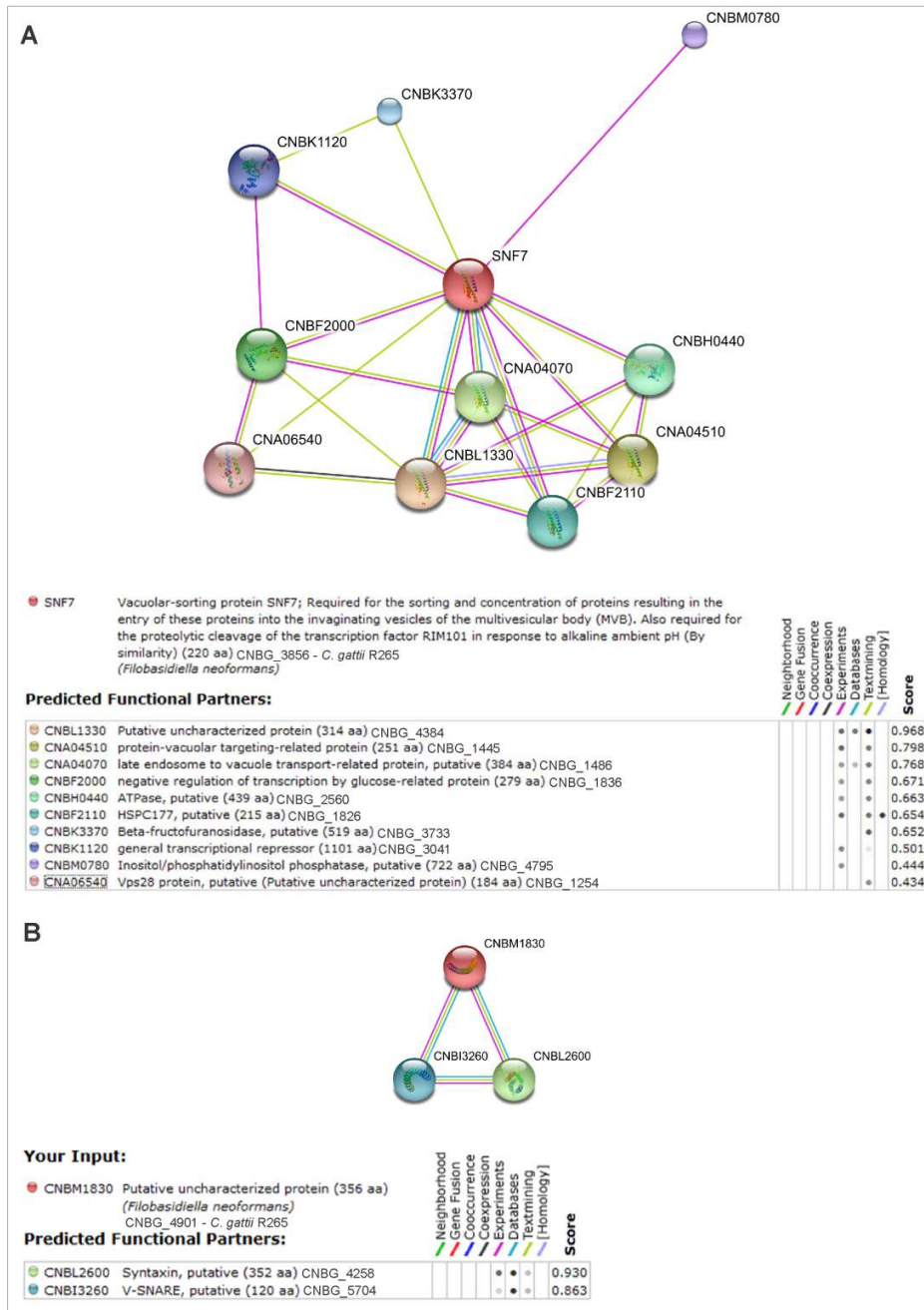


Fig. 4. Interactions of two upregulated proteins from comparative proteomic analysis. The resultant network is visualized using STRING database (<http://string-db.org/>) The SNF7 protein (A) and the hypothetical protein [CNBG_4901] (B) are involved in secretion pathways. The figure demonstrates the associations of these proteins with others derivate from experiments, databases or textmining.

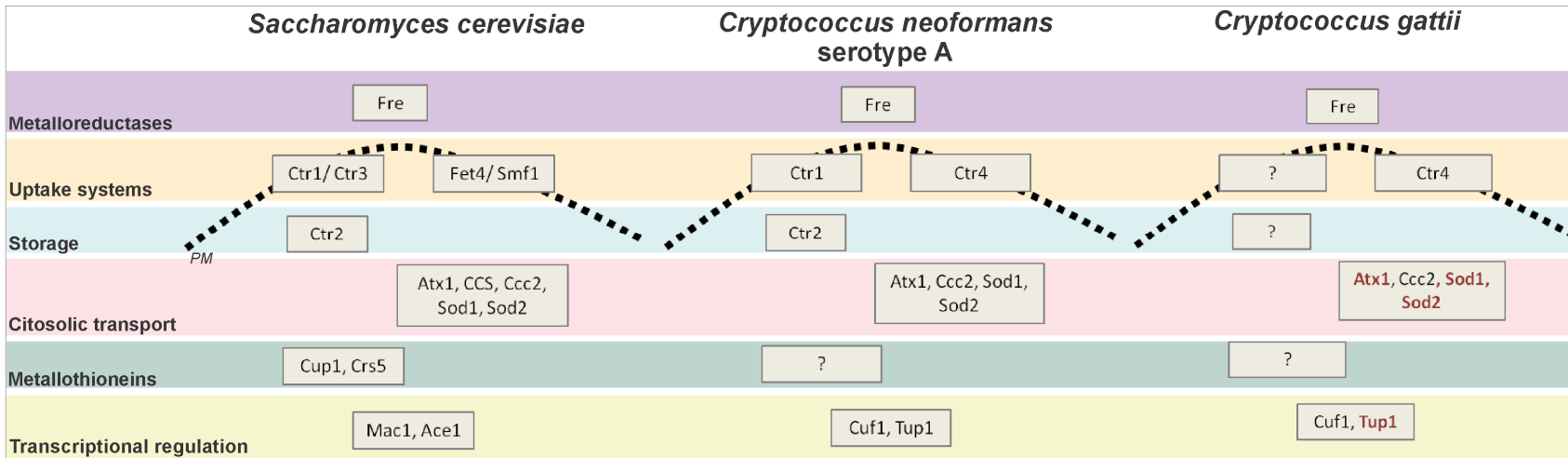


Fig. 5. Overview of the main components involved in the copper homeostasis in *S. cerevisiae*, *C. neoformans* serotype A and *C. gattii*. In red, proteins of *C. gattii* identified in this study.

Table 1. Comparative analysis of proteins after growth of *C. gattii* in LCM, in comparison to cultivation of the fungus in LCM+Cu. Proteins listed in this table were found to be statistically differentially expressed ($p < 0.01$) and have an absolute fold change greater than 2.5. The set of proteins also satisfies the BH-FDR of 0.05 criterion.

 BROAD Institute ID Protein name	Fold Change*
Catalytic activity	
<i>Hydrolase activity</i>	
CNBG_6075 S-adenosylhomocysteine hydrolase (432 aa)	-2.8
CNBG_2255 ATP-dependent chaperone ClpB (812 aa)	-10.3
<i>Isomerase activity</i>	
CNBG_0025 cyclophilin A (176 aa)	3.2
CNBG_5551 glucose-6-phosphate isomerase (557 aa)	-4
CNBG_4941 protein disulfide-isomerase (493 aa)	-5.3
<i>Ligase activity</i>	
CNBG_1640 pyruvate carboxylase (1204 aa)	-2.7
CNBG_1819 alanine-tRNA ligase (976 aa)	-3.1
CNBG_4832 leucine-tRNA ligase (1115 aa)	-4.1
CNBG_1647 glycine-tRNA ligase (684 aa)	-4.7
CNBG_0422 ubiquitin activating enzyme (1016 aa)	-6.8
<i>Lyase activity</i>	
CNBG_2278 UDP-xylose synthase (411 aa)	-5.9
<i>Oxidoreductase activity</i>	
CNBG_0564 oxidoreductase (306 aa)	-2.9
CNBG_5248 fatty acid synthase complex protein (1439 aa)	-3
CNBG_4764 aryl-alcohol dehydrogenase (393 aa)	-3.6
CNBG_5029 acyl-CoA oxidase (428 aa)	-3.7
CNBG_4706 UDP-glucose dehydrogenase (447 aa)	-4.4
CNBG_6205 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (293 aa)	-5
CNBG_5912 saccharopine dehydrogenase (396 aa)	-5.8
CNBG_1866 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (337 aa)	-19.5
<i>Transferase activity</i>	
CNBG_3052 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase (693 aa)	-3.1
CNBG_4763 aspartate transaminase (407 aa)	-4.2
CNBG_2968 transaldolase (324 aa)	-12.3
CNBG_1632 ATP synthase beta subunit (548 aa)	-15.8
Antioxidant activity	
CNBG_2132 thiol-specific antioxidant protein 1 (198 aa)	-8.6
Transporter activity	
CNBG_3856 vacuolar-sorting protein SNF7 (221 aa)	15.1
Structural molecule activity	
CNBG_3571 60S ribosomal protein L5-b (305 aa)	-2.8
CNBG_0793 60S ribosomal protein L18-A (191 aa)	-3.1
CNBG_5603 Ras2 protein (364 aa)	-4.1
CNBG_0519 60S ribosomal protein L9 (192 aa)	-5
CNBG_0140 60S ribosomal protein L10 (255 aa)	-7
CNBG_5762 ribosomal protein L8 (256 aa)	-10.8

Table 1. Continue.

BROAD Institute ID Protein name	Fold Change*
Unknown function	
CNBG_1321 cytoplasm protein (345 aa)	-2.6
CNBG_1429 actin (378 aa)	-2.8
Hypothetical protein	
CNBG_4901 conserved hypothetical protein (365 aa)	10.6
CNBG_5343 hypothetical protein (564 aa)	7
CNBG_3634 conserved hypothetical protein (739 aa)	-3.5
CNBG_4819 conserved hypothetical protein (384 aa)	-4
CNBG_1228 conserved hypothetical protein (606 aa)	-4.5
CNBG_0575 conserved hypothetical protein (650 aa)	-5
CNBG_4499 conserved hypothetical protein (671 aa)	-6.7
CNBG_3648 conserved hypothetical protein (112 aa)	-8.5
CNBG_0239 conserved hypothetical protein (615 aa)	-9.1
CNBG_0080 conserved hypothetical protein (258 aa)	-9.2

*LCM in comparison to LCM+Cu

Table 2. Proteins identified in this study and previously described as part of copper or iron homeostasis in other models.

BROAD ID	Gene/ organism	Predicted function	Condition of growth
CNBG_4942 acidic laccase	<i>fet5/ S. cerevisiae</i>	Ferroxidase	LCM+Cu
CNBG_4943 high-affinity iron permease CaFTR1	<i>fth1/ C. albicans</i>	Vacuolar transporter	LCM+Cu
CNBG_4540 membrane fraction protein	<i>ccc1/ S. cerevisiae</i>	Vacuolar transporter	LCM and LCM+Cu
CNBG_4670 conserved hypothetical protein	<i>yfh1/ S. cerevisiae</i>	Mitochondrial matrix iron chaperone	LCM+Cu
CNBG_4136 copper chaperone	<i>atx1/ S. cerevisiae</i>	Cytosolic copper metallochaperone	LCM+Cu
CNBG_0599 copper/zinc superoxide dismutase	<i>sod1/ S. cerevisiae</i>	Cytosolic superoxide dismutase	LCM and LCM+Cu
CNBG_2661 manganese superoxide dismutase	<i>sod2/ S. cerevisiae</i>	Mitochondrial superoxide dismutase	LCM and LCM+Cu
CNBG_5300 general transcriptional repressor (531 aa)	<i>tup1/ C. neoformans</i>	Transcriptional repressor	LCM+Cu

Supporting Information Available

Table S1. All proteins identified in MudPIT analysis. Proteins present in at least 1 replicate and identified with a minimum of 2 peptides.

Table S2. GO annotation according molecular function terms. Proteins were classified using Blast2GO tool.

Table S3. GO terms exclusively identified from proteins of *C. gattii* grown in LCM+Cu.

Fig. S1. Distribution, reproducibility and overlap from three (A, B, C) biological replicates of proteins of *C. gattii* identified from LCM (left) and LCM+Cu (right).

Disponível pelo site: <http://omicsdatalabfimb.wordpress.com/>

6. Capítulo III

Visão global das conexões existentes entre ferro e cobre para a manutenção da homeostase em *Cryptococcus gattii*

1. Introdução

Os metais de transição são essenciais para a vida, porque participam de reações de transferência de elétrons e são, por essa razão, cofatores de muitas enzimas metabólicas. Os metais ferro, cobre e manganês, por exemplo, são encontrados como grupos prostéticos de proteínas que catalizam reações de redução-oxidação. Porém, esses metais podem desencadear efeitos tóxicos nas células quando presentes em excesso, por induzirem a formação de espécies reativas de oxigênio. Devido a esse potencial tóxico, a manutenção da homeostase desses metais é essencial para as células.

Existem fortes evidências de inter-relações entre a homeostase de ferro e cobre, as quais podem ser evidenciadas em estudos no fungo modelo *Saccharomyces cerevisiae*, em bactérias, em mamíferos e em plantas (Valentine & Gralla 1997; Himelblau & Amasino 2000; De Freitas *et al.* 2003; Fox 2003; Chillappagari *et al.* 2010). Para o fungo patogênico *Cryptococcus neoformans*, estudos demonstrando conexões entre ferro e cobre já foram realizados, os quais abordam casos de interdependência de proteínas relacionadas à homeostase de ambos os metais (Jung *et al.* 2006; Jung & Kronstad 2008; Lee *et al.* 2009). Porém, para a espécie patogênica correlacionada a *C. neoformans*, *Cryptococcus gattii*, até o momento não existem relatos acerca desses mecanismos e de suas conexões.

Neste capítulo, iremos abordar as conexões entre os papéis relacionados aos micronutrientes ferro e cobre em *C. gattii*. Essas conexões foram evidenciadas através

de uma análise comparativa, global e de expressão diferencial, das proteínas obtidas das células de *C. gattii* cultivadas sob privação dos micronutrientes ferro e cobre. Pôde-se observar também, funções específicas desenvolvidas pela célula nessas situações.

2. Objetivos

O objetivo desse capítulo é avaliar a conexão existente entre as funções desempenhadas pelos micronutrientes ferro e cobre em *C. gattii*.

3. Material e Métodos

3.1 Comparações entre os proteomas de privação de ferro e cobre

As bibliotecas contendo as proteínas identificadas após o crescimento de *C. gattii* sob privação de ferro [LIM] e de cobre [LCM], descritas nos Capítulos I e II (disponíveis no site <http://omicsdatalabfimb.wordpress.com/>), foram submetidas à análise global e comparativa utilizando os módulos *Approximately Area Proportional Venn Diagram* (AAPVD) e *TFold* do software *PatternLab for Proteomics*, respectivamente (Carvalho *et al.* 2008; Carvalho *et al.* 2009). O meio LIM representa a privação de ferro, porém há cobre em sua composição; já o meio LCM representa limitação de cobre, mas contém ferro dentre seus componentes (composição dos

meios de cultivo disponível no site <http://omicsdatalabfimb.wordpress.com/>). Para a análise global, foram aceitas todas as proteínas identificadas em, no mínimo, uma réplica de cada condição, tendo sido identificadas com um mínimo de 2 peptídeos. A análise comparativa foi realizada conforme descrito nos Capítulos I e II, sendo que as proteínas presentes em no mínimo 8 das 12 réplicas de LCM e LIM foram analisadas.

3.2 Anotação funcional da classificação por Ontologia gênica (GO)

Para obtenção das categorias funcionais das proteínas, a ferramenta de busca disponível online, Blast2GO (<http://www.blast2go.org>), foi utilizada (Conesa *et al.* 2005; Gotz *et al.* 2008). Essa ferramenta assinala os termos da GO baseado em definições prévias obtidas pelo BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Foram submetidas as sequências das proteínas, em formato FASTA na plataforma Blast2GO, onde foram comparadas contra outros bancos de dados no NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/staff/tao/URLAPI/remote_blastdblist.html).

3.3 Western blot

Para as análises por western blot, 20µg de extrato total de proteínas de *C. gattii*, extraídas conforme descrito no capítulo I, foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de PVDF. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (37 kDa) foi detectada com soro policlonal anti-GAPDH de *Paracoccidioides brasiliensis*. A quantidade de proteínas utilizada foi controlada pela visualização das

proteínas separadas por SDS-PAGE e coradas com azul de Coomassie G-250. Os níveis de expressão foram quantificados com o auxílio do software ImageJ (NIH, Maryland, USA).

3.4 Ensaio enzimático

As atividades de proteases e metaloproteases foram determinadas utilizando o substrato fluorogênico, N-*t*-Boc-Gly-Arg-Arg-MCA (*t*-Boc, *tert*-Butyl carbamates; MCA, 7-amino-4-methylcoumarin) (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA). Todos os substratos estavam a uma concentração final de 2 μ M em um volume total de 100 μ l. A cinética da hidrólise foi monitorada em intervalos de 11s por fluorimetria, em um SpectraMax M2-e Microplate Reader (Molecular Devices Corporation, California, USA). O comprimento de onda para excitação e emissão foi de 370/ 460 nm (Oliveira *et al.* 1992). Amostras de proteínas de *C. gattii* provenientes dos cultivos em LIM e LCM (10 μ l, 20 μ g de proteínas), foram incubados por 10 min a 37°C em tampão Tris-HCl, pH 7.2, na presença ou ausência de específicos inibidores de protease 10 mM EDTA; 2 μ M pepstatina A; 10 μ M L-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)-butano (E-64) and, 100 μ M phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), primeiramente à adição do substrato. A atividade de peptidase foi gerada em nMoles de MCA, calculado a partir de uma curva padrão.

4. Resultados

4.1 Análise global do proteoma de *C. gattii* sob limitação de ferro e cobre

Tem sido evidenciado que alguns papéis relacionados a homeostase de ferro e cobre em *C. neoformans* são interconectados (Jung & Kronstad 2008). Porém, para *C. gattii*, isso não foi demonstrado até o momento. Por essa razão, os proteomas da resposta de *C. gattii* frente a limitação desses micronutrientes foram avaliados.

Um total de 1.079 e 544 proteínas foi identificado após o cultivo do fungo em meios de limitação de ferro (LIM) e limitação de cobre (LCM), respectivamente, sendo que dessas, 457 proteínas foram identificadas em ambas as condições. A Fig. 1 apresenta a distribuição das proteínas identificadas entre LIM e LCM.

Todas as proteínas identificadas foram caracterizadas quanto às suas funções moleculares e estão demonstradas na Tabela S1.

4.2 Análise da expressão diferencial das proteínas comuns entre LIM e LCM

Uma análise da expressão semi-quantitativa foi desenvolvida entre as proteínas de *C. gattii* identificadas de LIM e de LCM, da qual foram selecionadas 64 proteínas diferencialmente expressas. Dessas, 24 e 40 proteínas apresentaram expressão aumentada depois do crescimento do fungo em LIM (Tabela 1) e LCM (Tabela 2), respectivamente.

Proteínas relacionadas a processos envolvendo sinalização celular (ciclofilina A, 3.9), dobramento de proteínas (calnexina, 5.9), desenvolvimento celular (proteína ligante a poli(a) fabm, 3.4) e funções secretórias (proteína de distribuição vacuolar SNF7, 37.7; proteína de segregação nuclear Bfr1, 33.6) apresentaram-se com um aumento de expressão na condição LCM.

Proteínas mitocondriais apresentaram-se com expressão aumentada em ambos os cultivos. Por exemplo, proteínas relacionadas ao papel da pentose fosfato (deoxirribose-fosfato aldolase, 4.1; fosfogliconato desidrogenase, 6.9; transaldolase, 6.9) e glicólise/ gliconeogênese (fosfopiruvato hidratase, 4.3; fosfoenolpiruvato carboxikinase, 3.5; piruvato desidrogenase e1 componente da subunidade beta, 4.2; GAPDH, 54.6) demonstraram expressão aumentada em células de *C. gattii* crescidas em LIM (Tabela 1). Duas proteínas envolvidas no ciclo do ácido cítrico apresentaram expressão aumentada, uma no meio LCM (aconitase, 7.9) e a outra em LIM (formato desidrogenase, 5). Aconitase é uma proteína dependente de ferro, o que explica a expressão aumentada em LCM, se comparada a LIM. A proteína ornitina carbamoiltransferase (5.8-fold), que desempenha funções no ciclo da uréia; e a proteína adenilato kinase (16.1-fold), indiretamente envolvida na fosforilação oxidativa, se apresentaram reguladas positivamente em *C. gattii* sob limitação de cobre (Tabela 2).

Um número significativo de oxidoredutases apresentou expressão aumentada em LIM (Tabela 1). Essas enzimas catalisam uma ampla variedade de reações bioquímicas, e sua expressão aumentada em LIM pode refletir uma necessidade por cobre, ou outro metal presente no meio, em alguns desses processos.

A enzima glutathiona peroxidase apresentou uma expressão aumentada em LCM, quando comparada a LIM (Tabela 2). Sabe-se que a presença de cobre ou ferro em excesso é responsável pela geração de radicais livres, que podem ter sido gerados na condição de ausência de cobre/ presença de ferro em *C. gattii*, lembrando que o meio LCM possui ferro em sua composição.

4.3 Validação da análise de expressão diferencial

Um ensaio de *western blot* utilizando um anticorpo anti-GAPDH, contra proteínas extraídas de *C. gattii* crescido nas condições LIM e LCM, foi realizado para validar as análises de expressão diferencial. A Fig. 2 apresenta o resultado obtido, demonstrando a expressão aumentada da proteína GAPDH na condição LIM, quando comparada a LCM.

4.4 Possível mecanismo de controle da homeostase de ferro e cobre demonstrado por C. gattii

Em nosso estudo sobre a privação de ferro em *C. gattii*, foi observada uma reforçada atividade de proteases em células provenientes do cultivo de limitação de ferro, quando comparada a atividades de proteases oriundas das células cultivadas no meio controle, contendo ferro. Após essa evidência, foi hipotetizado um novo mecanismo de manutenção da homeostase de ferro em *C. gattii*, o qual está descrito no Capítulo I.

Para avaliar se as atividades enzimáticas são específicas da condição de limitação do micronutriente ferro em *C. gattii* ou, se poderia estar relacionada a condições de limitação de outros nutrientes, foi realizado um ensaio de protease nos extratos protéicos de *C. gattii* provenientes das condições LCM, LIM e LCM+Cu (controle). Como visualizado na Fig. 3, as atividades total e específica (metaloproteases) apresentaram-se aumentadas nas células obtidas após o crescimento de *C. gattii* em LCM e LIM, comparada as atividades oriundas das proteínas do controle. Esses resultados sugerem um possível controle pós-traducional utilizado por *C. gattii* para manter a homeostase de ferro e cobre em condições extremas da ausência desses metais.

5. Discussão

Este capítulo reporta uma visão ampla dos proteomas obtidos de *C. gattii* em resposta à privação dos micronutrientes ferro e cobre. Através de uma análise comparativa entre esses proteomas, foi possível visualizar as funções específicas afetadas pela falta cada metal em *C. gattii* e, algumas interconexões existentes para manter a homeostase de ferro e cobre nesse patógeno.

Os elementos essenciais envolvidos na homeostase de ferro e cobre estão bem esclarecidos em alguns modelos, os quais demonstram a existência de conexões dentre os mesmos. Por exemplo, na levedura modelo *S. cerevisiae*, o sistema de alta afinidade de absorção de ferro é mediado pelas enzimas dependentes de cobre, Fet3 e

Fet5, as quais reduzem Fe^{3+} a Fe^{2+} (Askwith *et al.* 1994; Stearman *et al.* 1996); já a absorção de cobre está associada com a atividade das redutases férricas de superfície, Fre1 e Fre2, convertendo Cu^{2+} a Cu^+ (Georgatsou *et al.* 1997). Em mamíferos, ocorre uma oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} durante o transporte de ferro do lúmen para a circulação sanguínea pelas enzimas multicobre-ferroxidase hefaestina e ceruloplasmina (Vulpe *et al.* 1999). Fet3 juntamente com ceruloplasmina está também envolvida na oxidação do cobre para prevenir os efeitos oxidativos do acúmulo de Cu^+ (Stoj & Kosman 2003). Existem ainda conexões acerca das funções biossintéticas envolvendo enzimas dependentes de ferro ou cobre. Por exemplo, foi observado em *S. cerevisiae*, que funções respiratórias foram reduzidas para preservar esses micronutrientes para outros processos celulares (van Bakel *et al.* 2005). Em nossa análise comparativa entre os proteomas de *C. gattii* sob limitação de ferro e/ou cobre, foi possível observar alterações nas funções metabólicas, principalmente àquelas relacionadas aos papéis mitocondriais da célula. Proteínas relacionadas à via da glicólise/gliconeogênese, ao papel da pentose fosfato e ao ciclo do ácido cítrico apresentaram um aumento em sua expressão sob limitação de ferro, quando comparada à limitação de cobre. Essas respostas são diferentes das respostas geralmente obtidas em estudos de privação de ferro em *S. cerevisiae* (van Bakel *et al.* 2005; Rustici *et al.* 2007; Shakoury-Elizeh *et al.* 2010). Em se tratando de metabolismo, *C. gattii* produz energia para a célula utilizando a via respiratória, diferente de *S. cerevisiae*, o qual produz energia para a célula por duas vias: a respiratória e a fermentativa. Nossos resultados sugerem que *C. gattii* possa fazer uso de mecanismos metabólicos compensatórios na ausência de ferro, como por exemplo utilizando proteínas dependentes de cobre, ou outro metal, para

evitar um retardo nas rotas metabólicas, o que levaria à morte celular. Há relatos na literatura de proteínas dependentes de metal, as quais tornaram-se mais acessíveis ao aporte de outros metais na ausência do metal a qual são dependentes (Dupont *et al.* 2006; Dupont *et al.* 2010). Porém mais estudos devem ser realizados para confirmar a existência desses mecanismos no patógeno *C. gattii*. Somente uma proteína relacionada ao ciclo do ácido cítrico, a aconitase, apresentou-se positivamente expressa sob limitação de cobre, comparado à limitação de ferro; essa proteína é dependente de ferro para sua ação, já tendo sido demonstrado em outros estudos que a ausência de ferro causa repressão da mesma (Eisenstein 2000; Lian *et al.* 2005).

Ferro e cobre são usados na catálise como cofatores para enzimas, tais como oxidoreduases (ambos os metais), transferases (ambos os metais), liases (ferro), isomerases (ferro) e ligases (ferro) (Andreini *et al.* 2008). Como visualizado nas tabelas 1 e 2, enzimas pertencentes a todas essas classes foram observadas nas condições LCM e LIM como diferencialmente expressas. Um grande número de proteínas pertencentes à classe das oxidoreduases apresentou-se com aumentada expressão na condição de privação de ferro. Sabe-se que as oxidoreduases comumente utilizam como cofatores os seguintes metais: cobre (93%), ferro (81%) e molibdênio mais tungstênio (81%) (Andreini *et al.* 2008). Nossos resultados sugerem, conforme o esperado, um balanço na utilização dessas classes de enzimas em condições de privação desses metais em *C. gattii*.

Quando alterações dos níveis de ferro ou cobre são sentidas pelas células, sabe-se que as mesmas respondem através da ativação ou repressão da expressão de genes ligados a manutenção da homeostase celular. Essa manutenção pode ser ligada

à absorção dos micronutrientes, ao transporte, a estocagem, ou mesmo ao controle da produção de proteínas dependentes do metal ao qual os níveis estão alterados (Shakoury-Elizeh *et al.* 2004; Eide *et al.* 2005; Waldron *et al.* 2009; Ihrig *et al.* 2010; Shakoury-Elizeh *et al.* 2010). Em *S. cerevisiae* e em *Schizosaccharomyces pombe*, sabe-se que esse controle é feito por fatores de transcrição reponsivos a metal, ou por alterações no metabolismo celular (Shakoury-Elizeh *et al.* 2004; Rustici *et al.* 2007; Shakoury-Elizeh *et al.* 2010). Por exemplo, os fatores de transcrição *AFT1* e *AFT2* respondem as alterações dos níveis de ferro e, *MAC1* e *ACE1*, respondem as flutuações dos níveis de cobre (Thiele 1988; Jensen & Winge 1998; Rutherford *et al.* 2003). Em nível transcricional e pós-transcricional, sabe-se que esses fatores controlam a homeostase celular de ferro e cobre em *S. cerevisiae*. Em *C. neoformans*, similar mecanismo de regulação transcricional e pós-transcricional ocorre através dos fatores de transcrição responsivos a ferro (*CIR1*) e a cobre (*CUF1*) (Jung *et al.* 2006; Waterman *et al.* 2007). O regulador global (*TUP1*), também é descrito por atuar na manutenção homeostase de ambos os metais neste patógeno (Lee *et al.* 2009). Em *C. gattii*, esses mecanismos regulatórios não foram elucidados até o momento, mas sabe-se da existência de sequencias similares a desses fatores de transcrição no genoma deste fungo. Em nossos resultados apresentados no capítulo I, sugerimos a existência de uma possível regulação pós-traducional desencadeada em *C. gattii* sob privação de ferro, baseada em resultados obtidos a partir de ensaios enzimáticos medindo a atividade de proteases produzidas pelo fungo. Esses resultados demonstraram aumentada atividade enzimática em células do fungo crescidas sob privação de ferro, quando comparadas à atividade derivada de células sob presença de ferro. Para

averiguar se essa regulação era específica para a limitação de ferro, ou faria parte de um controle mais abrangente, foram desenvolvidos os mesmos ensaios enzimáticos para células de *C. gattii* crescidas sob limitação e presença de cobre. Segundo nossos resultados apresentados na Fig. 3, atividade similar foi desenvolvida em cultivos oriundos da privação de ferro e cobre, sugerindo que essa possível regulação pós-traducional seja um mecanismo de manutenção geral da homeostase de metal em *C. gattii*.

6. Conclusão

Os resultados apresentados nesse capítulo ilustraram algumas conexões globais entre a homeostase de ferro e cobre em *C. gattii*. Porém, há um longo caminho para a completa elucidação dos mecanismos desempenhados por *C. gattii* para manter a homeostase celular em casos extremos da ausência dos micronutrientes ferro e cobre.

Referências

- Andreini, C., I. Bertini, G. Cavallaro, G. L. Holliday & J. M. Thornton, (2008) Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J Biol Inorg Chem* **13**: 1205-1218.
- Askwith, C., D. Eide, A. Van Ho, P. S. Bernard, L. Li, S. Davis-Kaplan, D. M. Sipe & J. Kaplan, (1994) The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. In: Cell. United States, pp. 403-410.
- Carvalho, P. C., J. S. Fischer, E. I. Chen, G. B. Domont, M. G. Carvalho, W. M. Degraeve, J. R. Yates & V. C. Barbosa, (2009) GO Explorer: A gene-ontology tool to aid in the interpretation of shotgun proteomics data. *Proteome Sci* **7**: 6.

- Carvalho, P. C., J. S. Fischer, E. I. Chen, J. R. Yates, 3rd & V. C. Barbosa, (2008) PatternLab for proteomics: a tool for differential shotgun proteomics. In: BMC Bioinformatics. England, pp. 316.
- Chillappagari S., Seubert A., Trip H., Kuipers O.P., Marahiel M.A. & Miethke M. (2010). Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster formation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 192, 2512-24.
- Conesa, A., S. Gotz, J. M. Garcia-Gomez, J. Terol, M. Talon & M. Robles, (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. In: Bioinformatics. England, pp. 3674-3676.
- De Freitas, J., H. Wintz, J. H. Kim, H. Poynton, T. Fox & C. Vulpe, (2003) Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. *Biometals* 16: 185-197.
- Dupont, C. L., A. Butcher, R. E. Valas, P. E. Bourne & G. Caetano-Anolles, (2010) History of biological metal utilization inferred through phylogenomic analysis of protein structures. In: Proc Natl Acad Sci U S A. United States, pp. 10567-10572.
- Dupont, C. L., S. Yang, B. Palenik & P. E. Bourne, (2006) Modern proteomes contain putative imprints of ancient shifts in trace metal geochemistry. In: Proc Natl Acad Sci U S A. United States, pp. 17822-17827.
- Eide, D. J., S. Clark, T. M. Nair, M. Gehl, M. Gribskov, M. L. Guerinot & J. F. Harper, (2005) Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol* 6: R77.
- Eisenstein, R. S., (2000) Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. In: Annu Rev Nutr. United States, pp. 627-662.
- Fox P.L. (2003). The copper-iron chronicles: the story of an intimate relationship. *Biometals*, 16, 9-40.
- Georgatsou, E., L. A. Mavrogiannis, G. S. Fragiadakis & D. Alexandraki, (1997) The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J Biol Chem* 272: 13786-13792.
- Gotz, S., J. M. Garcia-Gomez, J. Terol, T. D. Williams, S. H. Nagaraj, M. J. Nueda, M. Robles, M. Talon, J. Dopazo & A. Conesa, (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. In: Nucleic Acids Res. England, pp. 3420-3435.
- Himmelblau, E. & R. M. Amasino, (2000) Delivering copper within plant cells. In: Curr Opin Plant Biol. United States, pp. 205-210.
- Ihrig, J., A. Hausmann, A. Hain, N. Richter, I. Hamza, R. Lill & U. Mühlenhoff, (2010) Iron regulation through the back door: iron-dependent metabolite levels contribute to transcriptional adaptation to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 9: 460-471.
- Jensen, L. T. & D. R. Winge, (1998) Identification of a copper-induced intramolecular interaction in the transcription factor Mac1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 17: 5400-5408.
- Jung, W. H. & J. W. Kronstad, (2008) Iron and fungal pathogenesis: a case study with *Cryptococcus neoformans*. *Cell Microbiol* 10: 277-284.
- Jung, W. H., A. Sham, R. White & J. W. Kronstad, (2006) Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biol* 4: e410.

- Lee, H., Y. C. Chang, A. Varma & K. J. Kwon-Chung, (2009) Regulatory diversity of TUP1 in *Cryptococcus neoformans*. In: Eukaryot Cell. United States, pp. 1901-1908.
- Lian, T., M. I. Simmer, C. A. D'Souza, B. R. Steen, S. D. Zuyderduyn, S. J. Jones, M. A. Marra & J. W. Kronstad, (2005) Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **55**: 1452-1472.
- Oliveira, M. C., I. Y. Hirata, J. R. Chagas, P. Boschcov, R. A. Gomes, A. F. Figueiredo & L. Juliano, (1992) Intramolecularly quenched fluorogenic peptide substrates for human renin. In: Anal Biochem. United States, pp. 39-46.
- Rustici, G., H. van Bakel, D. H. Lackner, F. C. Holstege, C. Wijmenga, J. Bähler & A. Brazma, (2007) Global transcriptional responses of fission and budding yeast to changes in copper and iron levels: a comparative study. *Genome Biol* **8**: R73.
- Rutherford, J. C., S. Jaron & D. R. Winge, (2003) Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements. In: J Biol Chem. United States, pp. 27636-27643.
- Shakoury-Elizeh, M., O. Protchenko, A. Berger, J. Cox, K. Gable, T. M. Dunn, W. A. Prinz, M. Bard & C. C. Philpott, (2010) Metabolic response to iron deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **285**: 14823-14833.
- Shakoury-Elizeh, M., J. Tiedeman, J. Rashford, T. Ferea, J. Demeter, E. Garcia, R. Rolfes, P. O. Brown, D. Botstein & C. C. Philpott, (2004) Transcriptional remodeling in response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **15**: 1233-1243.
- Stearman, R., D. S. Yuan, Y. Yamaguchi-Iwai, R. D. Klausner & A. Dancis, (1996) A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* **271**: 1552-1557.
- Stoj, C. & D. J. Kosman, (2003) Cuprous oxidase activity of yeast Fet3p and human ceruloplasmin: implication for function. In: FEBS Lett. Netherlands, pp. 422-426.
- Thiele, D. J., (1988) ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Mol Cell Biol* **8**: 2745-2752.
- Valentine, J. S. & E. B. Gralla, (1997) Delivering copper inside yeast and human cells. *Science* **278**: 817-818.
- van Bakel, H., E. Strengman, C. Wijmenga & F. C. Holstege, (2005) Gene expression profiling and phenotype analyses of *S. cerevisiae* in response to changing copper reveals six genes with new roles in copper and iron metabolism. In: Physiol Genomics. United States, pp. 356-367.
- Vulpe, C. D., Y. M. Kuo, T. L. Murphy, L. Cowley, C. Askwith, N. Libina, J. Gitschier & G. J. Anderson, (1999) Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet* **21**: 195-199.
- Waldron, K. J., J. C. Rutherford, D. Ford & N. J. Robinson, (2009) Metalloproteins and metal sensing. In: Nature. England, pp. 823-830.
- Waterman, S. R., M. Hacham, G. Hu, X. Zhu, Y. D. Park, S. Shin, J. Panepinto, T. Valyi-Nagy, C. Beam, S. Husain, N. Singh & P. R. Williamson, (2007) Role of a CUF1/CTR4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest* **117**: 794-802.

Figuras e Tabelas

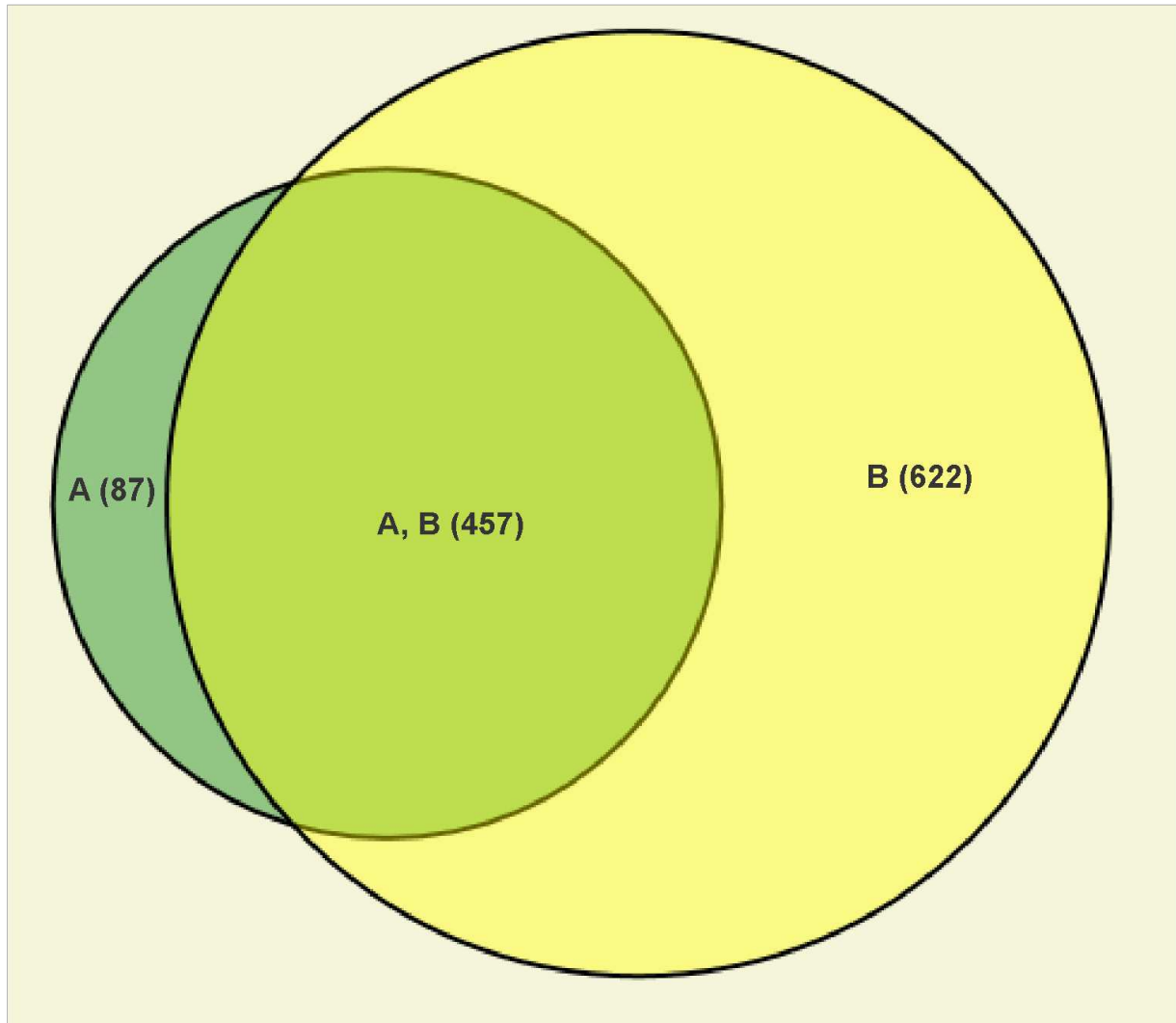


Figura 1. Distribuição e sobreposição das proteínas identificadas após o crescimento de *C. gattii* sob privação de cobre (A) e privação de ferro (B).

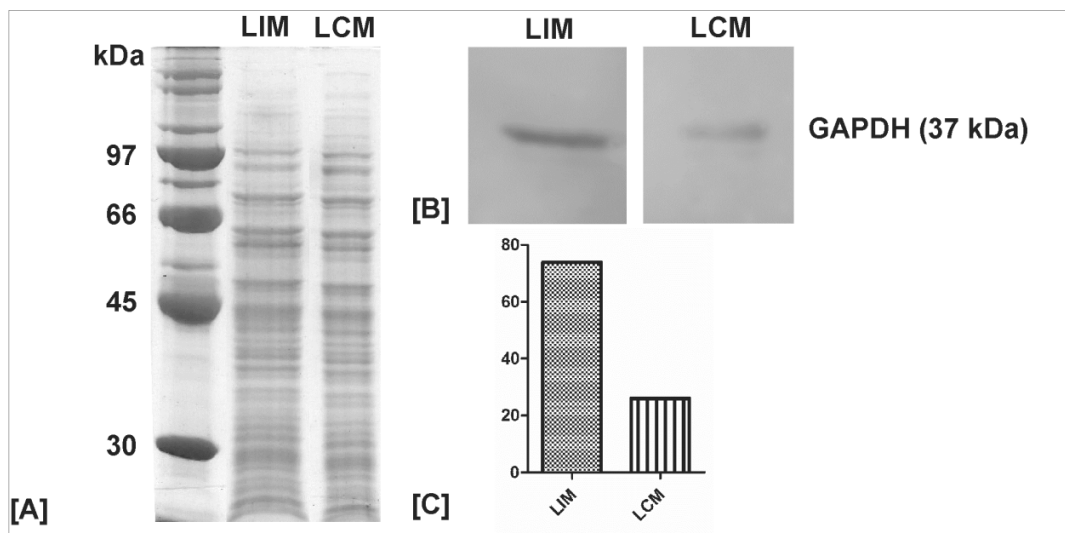


Figura 2. Avaliação da expressão da proteína GAPDH em extratos protéicos de *C. gattii* cultivado sob limitação de ferro ou cobre. Proteínas totais (20µg) foram separadas em um gel SDS-PAGE (A) e posteriormente transferidos para uma membrana de PVDF. A proteína GAPDH foi detectada a partir de anticorpo policlonal anti-GAPDH (B) e sua expressão foi quantificada (C).

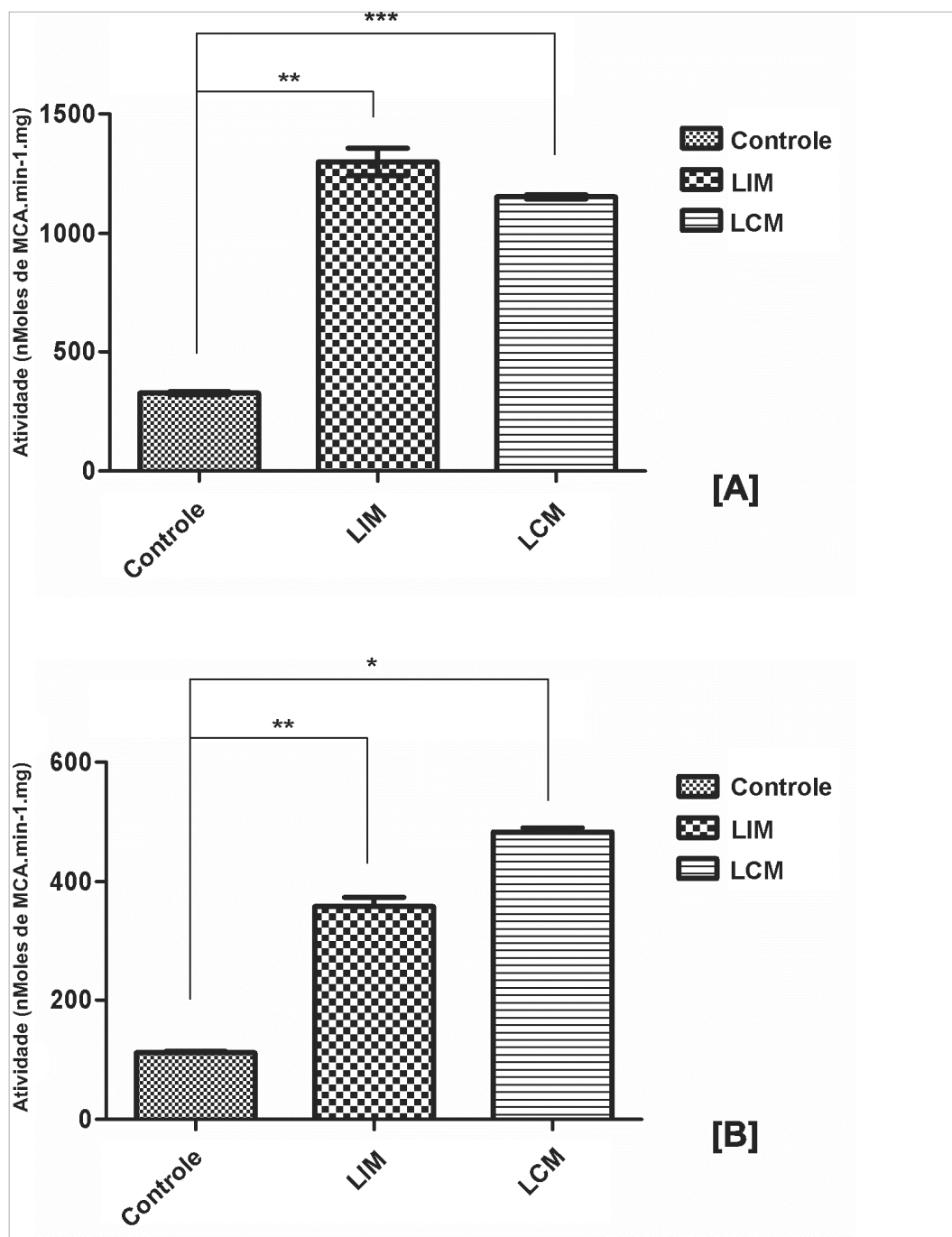


Figura 3. Atividade total de proteases (A) e atividade específica de metaloproteases (B) dos extratos de *C. gattii* cultivado em LIM, LCM e em um meio controle contendo ambos os metais. O substrato *N-t-Boc-Gly-Arg-Arg-MCA* foi utilizado nesta análise.

Tabela 1. Proteínas com expressão aumentada em células de *C. gattii* cultivadas em LIM, em comparação com células provenientes de LCM. As proteínas listadas na tabela abaixo se apresentaram diferencialmente expressas estatisticamente ($p < 0.01$), com uma diferença de expressão absoluta, maior que 2,5.

Identificação das proteínas	Expressão diferencial
<i>Atividade catalítica / Atividade de hidrolase</i>	
CNBG_5463 leucil aminopeptidase (933 aa)	2.7
<i>Atividade catalítica / Atividade de ligase</i>	
CNBG_1819 alanina-tRNA ligase (976 aa)	3
<i>Atividade catalítica / Atividade de liase</i>	
CNBG_3719 desoxiribose-fosfato aldolase (264 aa)	4.1
CNBG_3703 fosfopiruvato hidratase (434 aa)	4.3
<i>Atividade catalítica / Atividade de oxidoreductase</i>	
CNBG_5487 oxidoreductase (319 aa)	3.1
CNBG_5787 glicose-metanol-colina oxidoreductase (589 aa)	3.4
CNBG_2828 fosfoenolpiruvato carboxikinase (552 aa)	3.5
CNBG_4625 piruvato desidrogenase e1 componente da subunidade beta (408 aa)	4.2
CNBG_1896 formato desidrogenase (374 aa)	5
CNBG_3047 aldeído redutase (327 aa)	6.4
CNBG_3166 fosfogliconato desidrogenase (492 aa)	6.9
CNBG_4706 UDP-glicose desidrogenase (447 aa)	7
CNBG_1866 gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (337 aa)	54.6
<i>Atividade catalítica / Atividade de Transferase</i>	
CNBG_2968 transaldolase (324 aa)	6.9
CNBG_3502 aminotransferase (420 aa)	14
<i>Atividade Estrutural Molecular</i>	
CNBG_5603 proteína Ras2 (364 aa)	5.4
CNBG_4318 proteína ribossomal L4 (253 aa)	6.6
<i>Proteínas hipotéticas</i>	
CNBG_3117 proteína hipotética conservada (365 aa)	3.1
CNBG_5765 proteína hipotética conservada (257 aa)	3.1
CNBG_0239 proteína hipotética conservada (615 aa)	4.1
CNBG_4499 proteína hipotética conservada (671 aa)	6
CNBG_3197 proteína hipotética conservada (511 aa)	15.6

Tabela 2. Proteínas com expressão aumentada em células de *C. gattii* cultivadas em LCM, em comparação com células provenientes de LIM. As proteínas listadas na tabela abaixo apresentaram-se diferencialmente expressas ($p < 0.01$), com uma diferença de expressão absoluta, maior que 2,5.

Identificação das proteínas	Expressão diferencial
<i>Atividade catalítica / Atividade de hidrolase</i>	
CNBG_2101 fosfoserina fosfatase (264 aa)	4.5
CNBG_0733 glutamina-frutose-6-fosfato transaminase (707 aa)	4.3
<i>Atividade catalítica / Atividade de isomerase</i>	
CNBG_1618 peptidil-prolil cis-trans isomerase D (376 aa)	6.5
CNBG_0025 ciclofilina A (176 aa)	3.9
<i>Atividade catalítica / Atividade de ligase</i>	
CNBG_5137 aminoimidazol ribonucleotideo sintetase (803 aa)	3.1
<i>Atividade catalítica / Atividade de liase</i>	
CNBG_5789 glutamato decarboxilase (341 aa)	15.5
CNBG_0705 aconitase (781 aa)	7.9
<i>Atividade catalítica / Atividade de oxidoreductase</i>	
CNBG_5247 ácidos graxo sintase subunidade beta (2515 aa)	6.6
<i>Atividade catalítica / Atividade de transferase</i>	
CNBG_2947 adenilato kinase (270 aa)	16.1
CNBG_1047 glicina hidroximetiltransferase (500 aa)	9.5
CNBG_1488 metionina adenosiltransferase (398 aa)	7.1
CNBG_3466 ornitina carbamoiltransferase (371 aa)	5.8
<i>Ligante / Ligante a íons</i>	
CNBG_6004 proteína de agregação de actina ligante a Ca ²⁺ (625 aa)	12.7
CNBG_4198 calnexina (555 aa)	5.9
CNBG_3324 proteína predita (332 aa)	4.4
CNBG_3878 ligante a zinco desidrogenase (335 aa)	4.1
CNBG_2078 proteína C1-THFS (1022 aa)	3.9
<i>Ligante / Ligante a ácidos nucléicos</i>	
CNBG_4109 proteína de segregação nuclear Bfr1 (553 aa)	33.6
CNBG_3747 proteína ligante a RNA sce3 (499 aa)	10.7
CNBG_1489 fator de alongamento 1-gama (416 aa)	5
CNBG_2621 proteína ligante a poli(a) fabm (671 aa)	3.4
CNBG_4834 fator de alongamento de tradução EF1-alfa (460 aa)	3.3
<i>Ligante / Ligante a nucleotídeos</i>	
CNBG_5572 chaperonina (106 aa)	5.1
CNBG_5683 proteína MMS2 (811 aa)	5.8

Tabela 2. Continua.

Identificação das proteínas	Expressão diferencial
Ligante/ Ligante a proteínas	
CNBG_0489 proteína ativadora de GTPase específica de ran (241 aa)	10.5
CNBG_0829 proteína ligante a miosina I (1463 aa)	5.6
Atividade Antioxidante/ Atividade de peroxidase	
CNBG_5153 glutatona peroxidase (152 aa)	7.8
Atividade de Transporte	
CNBG_3856 proteína de distribuição vacuolar SNF7 (221 aa)	37.7
Atividade Estrutural Molecular	
CNBG_5639 molécula estrutural(1435 aa)	6.3
Função desconhecida	
CNBG_5228 proteína do citoplasma (1134 aa)	4
Proteínas hipotéticas	
CNBG_0295 proteína hipotética conservada (319 aa)	16.3
CNBG_2730 proteína hipotética conservada (114 aa)	14.7
CNBG_4901 proteína hipotética conservada (365 aa)	14.1
CNBG_2725 proteína hipotética conservada (1290 aa)	13.2
CNBG_1809 proteína hipotética conservada (1212 aa)	10.9
CNBG_5278 proteína hipotética conservada (909 aa)	8.6
CNBG_5343 proteína hipotética (564 aa)	6.5
CNBG_5147 proteína hipotética conservada (457 aa)	5.6
CNBG_5963 proteína hipotética conservada (603 aa)	5.3
CNBG_3940 proteína hipotética conservada (386 aa)	2.5

Material Suplementar

Tabela S1. Anotação das proteínas analisadas por ontologia gênica, de acordo com suas funções moleculares. As proteínas foram classificadas com o auxílio do software Blast2GO.

Disponível pelo site: <http://omicsdatalabfimb.wordpress.com/>

7. DISCUSSÃO

As funções exercidas pelas células para a manutenção da homeostase de ferro e/ou cobre demonstram um planejamento cauteloso, o qual serve para evitar a morte celular por toxicidade, ou ausência de proteínas funcionais dependentes de metal (Bleackley & Macgillivray 2011). Em se tratando de microrganismos patogênicos, muitos estudos demonstraram que os principais mecanismos envolvidos na homeostase de metais são conectados aos mecanismos envolvidos na virulência e na patogenicidade (Radtke & O'Riordan 2006; Ratledge 2007; Jung & Kronstad 2008). Essa junção de tarefas propicia a adaptação ao hospedeiro, o estabelecimento da doença e a proliferação dos patógenos. Estudos sobre a influência dos mecanismos de homeostase de ferro e cobre na expressão de fatores ligados à virulência já foram descritos para o patógeno *C. neoformans*, os quais demonstraram que essas inter-relações são fundamentais para a completa virulência do fungo (Jung & Kronstad 2008). Porém, até o momento, não há descrições na literatura acerca dos mecanismos utilizados para a manutenção da homeostase de ferro e/ou cobre na espécie patogênica *C. gattii*. Neste contexto, o presente trabalho foi desenvolvido tendo como objetivo principal o esclarecimento dos mecanismos utilizados por essa espécie patogênica para manter a homeostase desses micronutrientes. Para isso foi empregada uma técnica proteômica de identificação multidimensional de proteínas (MudPIT), a qual vem sendo amplamente utilizada em trabalhos envolvendo bactérias, fungos, plantas e humanos, com resultados confiáveis e reprodutíveis (Washburn *et al.* 2001; Washburn *et al.* 2003; Lee *et al.* 2007; Mauri & Dehò 2008; de Saldanha da Gama Fischer *et al.*

2010). Os proteomas de *C. gattii* crescido em meios de limitação/ presença de ferro ou cobre, foram obtidos com sucesso, totalizando mais de 1.000 proteínas identificadas. Esse número representa o mais expressivo proteoma obtido para essa espécie até o momento. Adicionalmente, foram realizados experimentos com géis bidimensionais (2D-GE), utilizando células de *C. gattii* preparadas conforme os experimentos de MudPIT. Em comparação aos resultados obtidos com ambas as técnicas, foi possível demonstrar que ambas são complementares, que geram resultados similares e, que por esse motivo podem ser utilizadas isoladamente ou em conjunto para estudos proteômicos globais em espécies de *Cryptococcus*.

Os resultados obtidos em nossas análises globais da privação de ferro em *C. gattii* demonstraram que o fungo resiste à alteração dos níveis desse micronutriente através de um remodelamento metabólico, envolvendo principalmente papéis metabólicos mitocondriais (Capítulo I). Essa alteração também foi descrita na levedura modelo *S. cerevisiae* e no patógeno *C. neoformans* (Lian *et al.* 2005; Shakoury-Elizeh *et al.* 2010). Em se tratando do papel da mitocôndria na levedura *C. gattii*, um estudo realizado por Ma e colaboradores (2009), demonstrou que as linhagens de *C. gattii* provenientes do surto de criptococose ocorrido no Canadá, possuem um forte aumento na capacidade de proliferação celular após a fagocitose, e os autores atribuem esse aumento à uma alteração na regulação mitocondrial (Ma *et al.* 2009). Em estudos futuros será interessante avaliar o papel do ferro na capacidade de proliferação celular em *C. gattii*, visto que muitas proteínas mitocondriais são dependentes desse micronutriente. Nossos resultados proteômicos demonstraram ainda que células oriundas da condição de presença de ferro (LIM+Fe) apresentaram um aumento da

expressão de uma proteína existente na membrana mitocondrial, o canal seletivo de íons dependente de voltagem (VDAC). Segundo dados da literatura atual, esse canal está envolvido principalmente na troca de metabólitos da mitocôndria para o citoplasma, no desencadeamento da apoptose, no mecanismo de redução/oxidação celular, dentre outras funções (Galganska *et al.* 2010; Shoshan-Barmatz *et al.* 2010), porém não há descrição do envolvimento do mesmo na homeostase de ferro. Como essa proteína apresenta múltiplas funções mitocondriais, ela poderia estar atuando como um sensor dos níveis de ferro em *C. gattii*, o qual desencadearia o remodelamento metabólico de papéis dependentes de ferro na mitocôndria, tais como a fosforilação oxidativa, a cadeia de transporte de elétrons, o ciclo do ácido cítrico, dentre outros. Porém, mais estudos serão necessários para entender o possível envolvimento desse canal de íons na homeostase de ferro em *C. gattii*.

C. gattii respondeu à privação do micronutriente cobre com uma expressiva redução do número de proteínas, retardo na proliferação celular e com um aumento da expressão de duas proteínas envolvidas em funções secretórias. Tem sido demonstrado que a ausência do micronutriente cobre resulta em danos no desenvolvimento e crescimento em *Arabidopsis*, em ratos, dentre outros (Turski & Thiele 2009; Steinebrunner *et al.* 2011). Nossos resultados demonstraram que a proliferação celular de *C. gattii* também é dramaticamente afetada na ausência de cobre. Em se tratando das funções secretórias destacadas no proteoma de *C. gattii* sob limitação de cobre, apresentaram-se com aumento de expressão uma proteína envolvida na distribuição vacuolar de proteínas, resultando na entrada das mesmas em vesículas (CNBG_3856) e, uma proteína hipotética conservada (CNBG_4901), a qual

possui similaridade de sequencia com proteínas pertencentes ao complexo t-SNARE, o qual está envolvido na exocitose de vesículas. Estudos com a levedura modelo *S. cerevisiae* demonstraram que alterações nos níveis de cobre celular resultaram em defeitos funcionais nas vias secretórias (Eide *et al.* 2005; van Bakel *et al.* 2005). Por esse motivo, nos trabalhos futuros com *C. gattii*, será interessante avaliar essas proteínas identificadas, juntamente com outras envolvidas em papéis secretórios, quanto à sua atuação na manutenção da homeostase de cobre em *C. gattii*. Outra resposta interessante, obtida de *C. gattii* crescido na presença de cobre, foi a identificação de proteínas atuantes em vias de sinalização celular, o que nos leva a especular um possível envolvimento dessas vias na regulação da homeostase desse metal em *C. gattii*. Até o momento, a busca por rotas de sinalização atuando como sensores das flutuações de cobre em outros modelos não obteve muitos resultados (Turski & Thiele 2009; Waldron *et al.* 2009). Embora esteja bem definido que a regulação da homeostase de metais é realizada por fatores de transcrição dependentes de metais (Rustici *et al.* 2007; Lee *et al.* 2009; Berthelet *et al.* 2010; Ihrig *et al.* 2010), há indícios que uma regulação via sinalização celular possa ocorrer em *C. gattii*, como observado nos dados proteômicos.

Os mecanismos empregados pelas células para manter a homeostase celular de metais apresentam-se conservados, de leveduras a humanos (Bleackley & Macgillivray 2011). Por exemplo, algumas sequencias homólogas de genes de leveduras já foram encontradas em humanos e sua caracterização genética e bioquímica demonstraram similaridades (Bleackley & Macgillivray 2011). Nos resultados proteômicos apresentados em relação a ferro e cobre em *C. gattii* (capítulos I e II), poucas proteínas

previamente descritas como atuantes na homeostase desses metais em *C. neoformans* foram encontradas. Isso pode ter acontecido devido à abundância celular dessas proteínas, visto que as proteínas envolvidas na homeostase de metal foram identificadas na análise proteômica com baixa contagem espectral. Outra hipótese para a ausência dessas proteínas seria a existência de alguns mecanismos distintos aos previamente elucidados para a manutenção da homeostase de ferro e cobre em *C. gattii*. Um exemplo de um possível mecanismo distinto seria a aumentada atividade total de proteases e específica de metaloproteases evidenciada a partir de células de *C. gattii* crescidas em privação de ferro e de cobre, quando comparadas as células crescidas na condição controle. Esse mecanismo atuaria pós-traducionalmente controlando a presença de proteínas dependentes de ferro ou cobre, os quais seriam remanejados para papéis específicos essenciais para o funcionamento celular. Para o esclarecimento desse processo, será necessária a avaliação do conjunto de substratos dessas enzimas e ainda, o período inicial da utilização desse mecanismo, visto que a análise proteômica desenvolvida nesse trabalho foi realizada a partir de células cultivadas por 12h. É provável que a célula utilize uma regulação pós-transcricional inicialmente, regulada por fatores de transcrição dependentes de metal e, posteriormente utilize um controle pós-traducional geral. Porém, mais estudos serão necessários para comprovar essas especulações.

As conexões existentes entre as funções exercidas para o controle da homeostase de metal estão bem definidas de leveduras a humanos (De Freitas *et al.* 2003; Collins *et al.* 2010). Os resultados obtidos através da análise proteômica de *C. gattii* na ausência de ferro ou cobre demonstraram principalmente a existência de

efeitos compensatórios nas funções metabólicas celulares. Esses efeitos poderiam ter sido originados a partir de um processo adaptativo deste patógeno, o qual também poderia estar conectado ao mecanismo de proliferação celular, citado como um dos fatores envolvidos na hipervirulência de isolados do surto de criptococose das ilhas Vancouver. Estudos avaliando proteínas dependentes de metal que fazem parte de papéis metabólicos mitocondriais essenciais na célula deveriam ser realizados para confirmar esse possível processo adaptativo de *C. gattii*. Na análise comparativa entre proteínas provenientes da privação de cobre contra as proteínas na limitação de ferro, pôde-se observar novamente, proteínas envolvidas em papéis secretórios ligados à ausência de cobre. Esses resultados levantam a hipótese de que algumas vias de secreção estariam diretamente ligadas à homeostase de cobre em *C. gattii*, as quais, em caso de ausência desse metal, poderiam atuar na exportação de proteínas específicas para o meio extracelular.

A elucidação dos mecanismos empregados na homeostase de ferro e cobre pela espécie *C. gattii* é de suma importância, primeiro por se tratar de um patógeno primário de humanos e de animais, e segundo, pela interação entre esses mecanismos de homeostasia com a expressão e atuação dos fatores de virulência dessa espécie. A linhagem R265 da espécie *C. gattii*, utilizada para o desenvolvimento desse trabalho, é um isolado clínico proveniente do surto de criptococose das ilhas Vancouver-Canadá, e pertence ao genótipo VGIIa, o qual é caracterizado como hipervirulento. Estudos futuros deveriam abordar análises comparativas entre os genótipos da espécie *C. gattii* para esclarecer a existência de eventos adaptativos entre o controle da homeostase de metais e os determinantes de virulência dessa espécie, os quais podem estar

conectados ao surgimento dos genótipos hipervirulentos presentes no Canadá, e mais recentemente nos Estados Unidos.

8. CONCLUSÕES

- Os papéis metabólicos mitocondriais são afetados quando *C. gattii* encontra-se sob privação do micronutriente ferro. Pôde-se notar a redução de proteínas relacionadas ao ciclo do ácido cítrico, a glicólise/gliconeogênese e a fosforilação oxidativa.
- Proteínas de ligação ao heme foram identificadas de células de *C. gattii* crescido em privação/ presença de ferro. Isso demonstra uma possível utilização do heme como sítio de ferro por *C. gattii*.
- A resposta celular global do fungo *C. gattii* sob limitação de ferro é similar à previamente descrita para *C. neoformans*. Porém, das proteínas já caracterizadas em *C. neoformans* como responsáveis pela homeostase de ferro, somente duas foram identificadas na análise proteômica global (Cir1 e Cfo1), sugerindo que *C. gattii* possa conter proteínas ou mecanismos distintos para a manutenção da homeostase celular desse metal.
- *C. gattii* e *C. neoformans* possuem similar atividade de redutases férricas de superfície celular.

- A relação entre a homeostase de ferro e a expressão dos fatores de virulência de *C. gattii* não ficou completamente esclarecida com a análise proteômica. Apenas duas proteínas, uma envolvida na produção da cápsula polissacarídica (UDP-glicose desidrogenase) e a outra, indiretamente ligada à produção de melanina (GMC-oxidoreductase), apresentaram expressão aumentada em células cultivadas sob privação de ferro.
- *C. gattii* reduz drasticamente a abundância de proteínas e a capacidade de proliferação celular durante situações de privação de cobre.
- Sob privação/ presença de cobre, foi observada a expressão de proteínas ligadas a vias de sinalização celular de *C. gattii*, porém não está clara a participação das mesmas no controle da homeostase desse metal neste patógeno.
- Duas proteínas ligadas a funções secretórias apresentaram um aumento de expressão em células de *C. gattii* crescidas sob limitação de cobre, o que indica uma possível atuação dessas funções na manutenção da homeostase desse metal em *C. gattii*.
- Proteínas relacionadas a papéis metabólicos apresentaram uma diminuição na expressão sob privação de cobre em *C. gattii*, demonstrando a necessidade desse metal em certos processos metabólicos do fungo.
- Componentes similares da maquinaria de manutenção da homeostase de *S. cerevisiae*, *C. neoformans* sorotipo A e *C. gattii* foram observadas, sugerindo sistemas de homeostase correspondentes entre essas espécies.

- Através da análise proteômica, não foram observadas conexões diretas entre a expressão de fatores de virulência e a manutenção da homeostase de cobre em *C. gattii*. Porém, sabe-se que algumas vias de sinalização e funções secretórias estão envolvidas na virulência da espécie *C. neoformans*. Portanto, mais estudos devem ser realizados para o esclarecimento dessas conexões em *C. gattii*.
- Exacerbada atividade de proteases/metaloproteases foi observada em células de *C. gattii* crescidas sob limitação de ferro e de cobre, quando comparadas à condição de presença dos micronutrientes. Com isso sugere-se um possível mecanismo pós-traducional de manutenção da homeostase de ferro e cobre em *C. gattii*.
- A técnica de MudPIT foi empregada com sucesso para o estudo de *C. gattii*, gerando resultados confiáveis e reprodutíveis.
- MudPIT e 2D-GE apresentaram resultados similares e também complementares no estudo de *C. gattii*, podendo ser utilizadas em conjunto ou individualmente para estudos globais de identificação de proteínas.

9. PERSPECTIVAS

- Construir mutantes nulos de *C. gattii* para o gene correspondente ao canal seletivo de íons dependente de voltagem (CNBG_3615). Esse canal atua na

troca de metabólitos entre o citoplasma e a mitocôndria e a geração de um mutante para esse gene auxiliará no esclarecimento de um possível papel desse canal na manutenção da homeostase de ferro em *C. gattii*;

- Construir mutantes nulos de *C. gattii* para os genes correspondentes as seguintes proteínas: proteína de distribuição vacuolar SNF7 (CNBG_3856) e, proteína hipotética conservada (CNBG_4901). A geração de linhagens mutantes para esses genes é necessária para avaliar a influência dos sistemas secretórios na manutenção da homeostase de cobre em *C. gattii*;
- Realizar ensaios de atividade de protease em linhagens de *C. neoformans* sorotipos A e D, *C. gattii* sorotipos B e C e *S. cerevisiae*, crescidas sob presença/ausência de ferro ou cobre em períodos variando de 2 a 24h. Esses experimentos poderão esclarecer se essa resposta à limitação de micronutrientes é específica de *C. gattii* ou se é comum a outras leveduras. E adicionalmente, com os testes de atividade em diferentes tempos de cultivo poderemos averiguar se essa é uma resposta tardia, ou seja, após a resposta transcricional inicial, ou se ela inicia no momento em que a célula reconhece a falta de micronutrientes.

10. REFERÊNCIAS

(CDC) C.f.D.C.a.P. (2010). Emergence of *Cryptococcus gattii*-- Pacific Northwest, 2004-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 59, 865-8.

- Abegg M.A., Cella F.L., Faganello J., Valente P., Schrank A. & Vainstein M.H. (2006). *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia*, 161, 83-91.
- Akhter S., McDade H.C., Gorlach J.M., Heinrich G., Cox G.M. & Perfect J.R. (2003). Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 71, 5794-802.
- Aksenov S.I., Babyeva I.P. & Golubev V.I. (1973). On the mechanism of adaptation of micro-organisms to conditions of extreme low humidity. *Life Sci Space Res*, 11, 55-61.
- Almeida R.S., Wilson D. & Hube B. (2009a). *Candida albicans* iron acquisition within the host. In: *FEMS Yeast Res* England, pp. 1000-12.
- Almeida R.S., Wilson D. & Hube B. (2009b). *Candida albicans* iron acquisition within the host. *FEMS Yeast Res*, 9, 1000-12.
- Alspaugh J.A., Cavallo L.M., Perfect J.R. & Heitman J. (2000). RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, 36, 352-65.
- Alspaugh J.A., Pukkila-Worley R., Harashima T., Cavallo L.M., Funnell D., Cox G.M., Perfect J.R., Kronstad J.W. & Heitman J. (2002). Adenylyl cyclase functions downstream of the Galpha protein Gpa1 and controls mating and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 1, 75-84.
- Alvarez M. & Casadevall A. (2006). Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol*, 16, 2161-5.
- Alvarez M. & Casadevall A. (2007). Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. *BMC Immunol*, 8, 16.
- Ambatipudi K., Old J., Guilhaus M., Raftery M., Hinds L. & Deane E. (2006). Proteomic analysis of the neutrophil proteins of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). In: *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* Netherlands, pp. 283-91.
- Andreini C., Bertini I., Cavallaro G., Holliday G.L. & Thornton J.M. (2008). Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J Biol Inorg Chem*, 13, 1205-18.
- Andrews S.C., Robinson A.K. & Rodríguez-Quiñones F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev*, 27, 215-37.
- Arnesano F., Banci L., Bertini I., Cantini F., Ciofi-Baffoni S., Huffman D.L. & O'Halloran T.V. (2001). Characterization of the binding interface between the copper chaperone Atx1 and the first cytosolic domain of Ccc2 ATPase. In: *J Biol Chem* United States, pp. 41365-76.
- Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A., Botstein D., Butler H., Cherry J.M., Davis A.P., Dolinski K., Dwight S.S., Eppig J.T., Harris M.A., Hill D.P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J.C., Richardson J.E., Ringwald M., Rubin G.M. & Sherlock G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*, 25, 25-9.
- Askwith C., Eide D., Van Ho A., Bernard P.S., Li L., Davis-Kaplan S., Sipe D.M. & Kaplan J. (1994). The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. In: *Cell* United States, pp. 403-10.

- Bahn Y.S., Cox G.M., Perfect J.R. & Heitman J. (2005). Carbonic anhydrase and CO₂ sensing during *Cryptococcus neoformans* growth, differentiation, and virulence. *Curr Biol*, 15, 2013-20.
- Banci L., Bertini I., Cantini F. & Ciofi-Baffoni S. (2010a). Cellular copper distribution: a mechanistic systems biology approach. *Cell Mol Life Sci*, 67, 2563-89.
- Banci L., Bertini I., McGreevy K.S. & Rosato A. (2010b). Molecular recognition in copper trafficking. *Nat Prod Rep*, 27, 695-710.
- Bar-Peled M., Griffith C.L. & Doering T.L. (2001). Functional cloning and characterization of a UDP- glucuronic acid decarboxylase: the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* elucidates UDP-xylose synthesis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A United States*, pp. 12003-8.
- Barbosa M.S., Bao S.N., Andreotti P.F., de Faria F.P., Felipe M.S., dos Santos Feitosa L., Mendes-Giannini M.J. & Soares C.M. (2006). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. In: *Infect Immun United States*, pp. 382-9.
- Barluzzi R., Saleppico S., Nocentini A., Boelaert J.R., Neglia R., Bistoni F. & Blasi E. (2002). Iron overload exacerbates experimental meningoencephalitis by *Cryptococcus neoformans*. *J Neuroimmunol*, 132, 140-6.
- Bartlett K.H., Kidd S.E. & Kronstad J.W. (2008). The emergence of *Cryptococcus gattii* in British Columbia and the Pacific Northwest. *Curr Infect Dis Rep*, 10, 58-65.
- Benjamini Y. & Hochberg Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B*, 57, 289-300.
- Berkow R.L. & Dodson R.W. (1990). Tyrosine-specific protein phosphorylation during activation of human neutrophils. *Blood*, 75, 2445-52.
- Berthelet S., Usher J., Shulist K., Hamza A., Maltez N., Johnston A., Fong Y., Harris L.J. & Baetz K. (2010). Functional genomics analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* iron responsive transcription factor Aft1 reveals iron-independent functions. *Genetics*, 185, 1111-28.
- Blaiseau P.L., Lesuisse E. & Camadro J.M. (2001). Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. In: *J Biol Chem United States*, pp. 34221-6.
- Blatch G. & Lässle M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays*, 21, 932-939.
- Bleackley M.R. & Macgillivray R.T. (2011). Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. *Biomaterials*.
- Bodasing N., Seaton R.A., Shankland G.S. & Kennedy D. (2004). *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis in an HIV-positive patient: first observation in the United Kingdom. In: *J Infect England*, pp. 253-5.
- Boekhout T., Theelen B., Diaz M., Fell J.W., Hop W.C., Abeln E.C., Dromer F. & Meyer W. (2001). Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 147, 891-907.
- Broetto L., Da Silva W.O., Bailao A.M., De Almeida Soares C., Vainstein M.H. & Schrank A. (2010). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the

- entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: cell-surface localization and role in host adhesion. *FEMS Microbiol Lett*, 312, 101-9.
- Byrnes E.J., Bildfell R.J., Frank S.A., Mitchell T.G., Marr K.A. & Heitman J. (2009a). Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. *J Infect Dis*, 199, 1081-6.
- Byrnes E.J. & Heitman J. (2009). *Cryptococcus gattii* outbreak expands into the Northwestern United States with fatal consequences. *F1000 Biol Rep*, 1.
- Byrnes E.J., Li W., Lewit Y., Ma H., Voelz K., Ren P., Carter D.A., Chaturvedi V., Bildfell R.J., May R.C. & Heitman J. (2010). Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. *PLoS Pathog*, 6, e1000850.
- Byrnes E.J., Li W., Lewit Y., Perfect J.R., Carter D.A., Cox G.M. & Heitman J. (2009b). First reported case of *Cryptococcus gattii* in the Southeastern USA: implications for travel-associated acquisition of an emerging pathogen. *PLoS One*, 4, e5851.
- Campbell L.T. & Carter D.A. (2006). Looking for sex in the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res*, 6, 588-98.
- Campbell L.T., Currie B.J., Krockenberger M., Malik R., Meyer W., Heitman J. & Carter D. (2005). Clonality and recombination in genetically differentiated subgroups of *Cryptococcus gattii*. *Eukaryot Cell*, 4, 1403-9.
- Carrozza M.J., Florens L., Swanson S.K., Shia W.J., Anderson S., Yates J., Washburn M.P. & Workman J.L. (2005). Stable incorporation of sequence specific repressors Ash1 and Ume6 into the Rpd3L complex. In: *Biochim Biophys Acta Netherlands*, pp. 77-87; discussion 75-6.
- Carvalho P.C., Fischer J.S., Chen E.I., Domont G.B., Carvalho M.G., Degraeve W.M., Yates J.R. & Barbosa V.C. (2009). GO Explorer: A gene-ontology tool to aid in the interpretation of shotgun proteomics data. *Proteome Sci*, 7, 6.
- Carvalho P.C., Fischer J.S., Chen E.I., Yates J.R., 3rd & Barbosa V.C. (2008). PatternLab for proteomics: a tool for differential shotgun proteomics. In: *BMC Bioinformatics England*, p. 316.
- Carvalho P.C., Yates J.R. & Barbosa V.C. (2010). Analyzing shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics. *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 13, Unit 13.13.1-15.
- Casadevall A. & Perfect J.R. (1998). *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington, D.C.
- Chang Y.C., Bien C.M., Lee H., Espenshade P.J. & Kwon-Chung K.J. (2007). Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. In: *Mol Microbiol England*, pp. 614-29.
- Chang Y.C. & Kwon-Chung K.J. (1994). Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol*, 14, 4912-9.
- Chang Y.C. & Kwon-Chung K.J. (1998). Isolation of the third capsule-associated gene, CAP60, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 66, 2230-6.

- Chang Y.C. & Kwon-Chung K.J. (1999). Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol*, 181, 5636-43.
- Chang Y.C., Penoyer L.A. & Kwon-Chung K.J. (1996). The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. *Infect Immun*, 64, 1977-83.
- Charlier C., Nielsen K., Daou S., Brigitte M., Chretien F. & Dromer F. (2009). Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. In: *Infect Immun United States*, pp. 120-7.
- Chayakulkeeree M. & Perfect J.R. (2006). Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*, 20, 507-44, v-vi.
- Chen L.C., Blank E.S. & Casadevall A. (1996). Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 3, 570-4.
- Chen O. & Kaplan J. (2000). CCC1 suppresses mitochondrial damage in the yeast model of Friedreich's ataxia by limiting mitochondrial iron accumulation. *J Biol Chem*, 275, 7626-7632.
- Chen S., Sorrell T., Nimmo G., Speed B., Currie B., Ellis D., Marriott D., Pfeiffer T., Parr D. & Byth K. (2000). Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. In: *Clin Infect Dis United States*, pp. 499-508.
- Chen S.C., Currie B.J., Campbell H.M., Fisher D.A., Pfeiffer T.J., Ellis D.H. & Sorrell T.C. (1997). *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* infection in northern Australia: existence of an environmental source other than known host eucalypts. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 91, 547-50.
- Cherayil B.J. (2010). The role of iron in the immune response to bacterial infection. *Immunol Res*.
- Cherniak R. & Sundstrom J.B. (1994). Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 62, 1507-12.
- Chillappagari S., Seubert A., Trip H., Kuipers O.P., Marahiel M.A. & Miethke M. (2010). Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster formation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 192, 2512-24.
- Choe L.H., Aggarwal K., Franck Z. & Lee K.H. (2005). A comparison of the consistency of proteome quantitation using two-dimensional electrophoresis and shotgun isobaric tagging in *Escherichia coli* cells. *Electrophoresis*, 26, 2437-49.
- Chrisman C.J., Albuquerque P., Guimaraes A.J., Nieves E. & Casadevall A. (2011). Phospholipids Trigger *Cryptococcus neoformans* Capsular Enlargement during Interactions with Amoebae and Macrophages. *PLoS Pathog*, 7, e1002047.
- Chun C.D. & Madhani H.D. (2010). Ctr2 links copper homeostasis to polysaccharide capsule formation and phagocytosis inhibition in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*, 5.
- Collins J.F., Prohaska J.R. & Knutson M.D. (2010). Metabolic crossroads of iron and copper. In: *Nutr Rev United States*, pp. 133-47.
- Conesa A., Gotz S., Garcia-Gomez J.M., Terol J., Talon M. & Robles M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. In: *Bioinformatics England*, pp. 3674-6.

- Cottrell T.R., Griffith C.L., Liu H., Nenninger A.A. & Doering T.L. (2007). The pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* expresses two functional GDP-mannose transporters with distinct expression patterns and roles in capsule synthesis. *Eukaryot Cell*, 6, 776-85.
- Courel M., Lallet S., Camadro J.M. & Blaiseau P.L. (2005). Direct activation of genes involved in intracellular iron use by the yeast iron-responsive transcription factor Aft2 without its paralog Aft1. In: *Mol Cell Biol* United States, pp. 6760-71.
- Cox G.M., McDade H.C., Chen S.C., Tucker S.C., Gottfredsson M., Wright L.C., Sorrell T.C., Leidich S.D., Casadevall A., Ghannoum M.A. & Perfect J.R. (2001). Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. In: *Mol Microbiol* England, pp. 166-75.
- Cox G.M., Mukherjee J., Cole G.T., Casadevall A. & Perfect J.R. (2000). Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun*, 68, 443-8.
- Cramer K.L., Gerrald Q.D., Nichols C.B., Price M.S. & Alspaugh J.A. (2006). Transcription factor Nrg1 mediates capsule formation, stress response, and pathogenesis in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 5, 1147-56.
- Cruz M.C., Sia R.A., Olson M., Cox G.M. & Heitman J. (2000). Comparison of the roles of calcineurin in physiology and virulence in serotype D and serotype A strains of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 68, 982-5.
- Culotta V.C., Howard W.R. & Liu X.F. (1994). CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 269, 25295-302.
- D'Souza C.A., Alspaugh J.A., Yue C., Harashima T., Cox G.M., Perfect J.R. & Heitman J. (2001). Cyclic AMP-dependent protein kinase controls virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol*, 21, 3179-91.
- D'Souza C.A., Kronstad J.W., Taylor G., Warren R., Yuen M., Hu G., Jung W.H., Sham A., Kidd S.E., Tangen K., Lee N., Zeilmaker T., Sawkins J., McVicker G., Shah S., Gnerre S., Griggs A., Zeng Q., Bartlett K., Li W., Wang X., Heitman J., Stajich J.E., Fraser J.A., Meyer W., Carter D., Schein J., Krzywinski M., Kwon-Chung K.J., Varma A., Wang J., Brunham R., Fyfe M., Ouellette B.F., Siddiqui A., Marra M., Jones S., Holt R., Birren B.W., Galagan J.E. & Cuomo C.A. (2011). Genome Variation in *Cryptococcus gattii*, an Emerging Pathogen of Immunocompetent Hosts. In: *MBio* United States.
- Datta K., Bartlett K.H., Baer R., Byrnes E., Galanis E., Heitman J., Hoang L., Leslie M.J., MacDougall L., Magill S.S., Morshed M.G., Marr K.A. & Northwest C.g.W.G.o.t.P. (2009). Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States. *Emerg Infect Dis*, 15, 1185-91.
- De Freitas J., Wintz H., Kim J.H., Poynton H., Fox T. & Vulpe C. (2003). Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. *Biometals*, 16, 185-97.
- de Saldanha da Gama Fischer J., Costa Carvalho P., da Fonseca C.O., Liao L., Degraeve W.M., da Gloria da Costa Carvalho M., Yates J.R. & Domont G.B. (2010). Chemo-Resistant Protein Expression Pattern of Glioblastoma Cells (A172) to Perillyl Alcohol. *J Proteome Res*.
- Del Poeta M. (2004). Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 3, 1067-75.
- DeMoor J.M. & Koropatnick D.J. (2000). Metals and cellular signaling in mammalian cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 46, 367-81.

- Dill B.D., Dessus-Babus S. & Raulston J.E. (2009). Identification of iron-responsive proteins expressed by *Chlamydia trachomatis* reticulate bodies during intracellular growth. In: *Microbiology* England, pp. 210-9.
- Dimmer K.S. & Rapaport D. (2008). Proteomic view of mitochondrial function. In: *Genome Biol* England, p. 209.
- Duncan C., Stephen C. & Campbell J. (2006a). Clinical characteristics and predictors of mortality for *Cryptococcus gattii* infection in dogs and cats of southwestern British Columbia. *Can Vet J*, 47, 993-8.
- Duncan C., Stephen C., Lester S. & Bartlett K.H. (2005). Sub-clinical infection and asymptomatic carriage of *Cryptococcus gattii* in dogs and cats during an outbreak of cryptococcosis. *Med Mycol*, 43, 511-6.
- Duncan C.G., Stephen C. & Campbell J. (2006b). Evaluation of risk factors for *Cryptococcus gattii* infection in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*, 228, 377-82.
- Dunn L.L., Rahmanto Y.S. & Richardson D.R. (2007). Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol*, 17, 93-100.
- Dupont C.L., Butcher A., Valas R.E., Bourne P.E. & Caetano-Anolles G. (2010). History of biological metal utilization inferred through phylogenomic analysis of protein structures. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* United States, pp. 10567-72.
- Dupont C.L., Yang S., Palenik B. & Bourne P.E. (2006). Modern proteomes contain putative imprints of ancient shifts in trace metal geochemistry. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* United States, pp. 17822-7.
- Eide D.J., Clark S., Nair T.M., Gehl M., Gribskov M., Guerinot M.L. & Harper J.F. (2005). Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol*, 6, R77.
- Eisenstein R.S. (2000). Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. In: *Annu Rev Nutr* United States, pp. 627-62.
- Ellis D., Marriott D., Hajjeh R.A., Warnock D., Meyer W. & Barton R. (2000). Epidemiology: surveillance of fungal infections. *Med Mycol*, 38 Suppl 1, 173-82.
- Ellis D.H. & Pfeiffer T.J. (1990). Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol*, 28, 1642-4.
- Eng J., McCormack A. & Yates JR. r. (1994). An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 5, 976-989.
- Erickson T., Liu L., Gueyikian A., Zhu X., Gibbons J. & Williamson P.R. (2001). Multiple virulence factors of *Cryptococcus neoformans* are dependent on VPH1. In: *Mol Microbiol* England, pp. 1121-31.
- Fischer Jde S., Liao L., Carvalho P.C., Barbosa V.C., Domont G.B., Carvalho Mda G. & Yates J.R., 3rd (2010). Dynamic proteomic overview of glioblastoma cells (A172) exposed to perillyl alcohol. In: *J Proteomics*. 2010 Elsevier B.V Netherlands, pp. 1018-27.
- Florens L., Washburn M.P., Raine J.D., Anthony R.M., Grainger M., Haynes J.D., Moch J.K., Muster N., Sacci J.B., Tabb D.L., Witney A.A., Wolters D., Wu Y., Gardner M.J., Holder A.A., Sinden R.E., Yates J.R. & Carucci D.J. (2002). A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*, 419, 520-6.

- Fonseca F.L., Nohara L.L., Cordero R.J., Frases S., Casadevall A., Almeida I.C., Nimrichter L. & Rodrigues M.L. (2010). Immunomodulatory effects of serotype B glucuronoxylomannan from *Cryptococcus gattii* correlate with polysaccharide diameter. *Infect Immun*, 78, 3861-70.
- Fox D.S., Cox G.M. & Heitman J. (2003). Phospholipid-binding protein Cts1 controls septation and functions coordinately with calcineurin in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 2, 1025-35.
- Fox P.L. (2003). The copper-iron chronicles: the story of an intimate relationship. *Biometals*, 16, 9-40.
- Fraser J.A., Giles S.S., Wenink E.C., Geunes-Boyer S.G., Wright J.R., Diezmann S., Allen A., Stajich J.E., Dietrich F.S., Perfect J.R. & Heitman J. (2005). Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature*, 437, 1360-4.
- Fraser J.A. & Heitman J. (2004). Evolution of fungal sex chromosomes. In: *Mol Microbiol* England, pp. 299-306.
- Fraser J.A., Subaran R.L., Nichols C.B. & Heitman J. (2003). Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. *Eukaryot Cell*, 2, 1036-45.
- Frealde E., Noel C., Viscogliosi E., Camus D., Dei-Cas E. & Delhaes L. (2005). Manganese superoxide dismutase in pathogenic fungi: an issue with pathophysiological and phylogenetic involvements. In: *FEMS Immunol Med Microbiol* Netherlands, pp. 411-22.
- Fyfe M., MacDougall L., Romney M., Starr M., Pearce M., Mak S., Mithani S. & Kibsey P. (2008). *Cryptococcus gattii* infections on Vancouver Island, British Columbia, Canada: emergence of a tropical fungus in a temperate environment. *Can Commun Dis Rep*, 34, 1-12.
- Galanis E. & Macdougall L. (2010). Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. *Emerg Infect Dis*, 16, 251-7.
- Galganska H., Karachitos A., Wojtkowska M., Stobienia O., Budzinska M. & Kmita H. (2010). Communication between mitochondria and nucleus: putative role for VDAC in reduction/oxidation mechanism. In: *Biochim Biophys Acta*. 2010 Elsevier B.V Netherlands, pp. 1276-80.
- Ganendren R., Carter E., Sorrell T., Widmer F. & Wright L. (2006). Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. In: *Microbes Infect* France, pp. 1006-15.
- Garcia-Rivera J., Tucker S.C., Feldmesser M., Williamson P.R. & Casadevall A. (2005). Laccase expression in murine pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. In: *Infect Immun* United States, pp. 3124-7.
- Gatlin C.L., Kleemann G.R., Hays L.G., Link A.J. & Yates J.R., 3rd (1998). Protein identification at the low femtomole level from silver-stained gels using a new fritless electrospray interface for liquid chromatography-microspray and nanospray mass spectrometry. In: *Anal Biochem*. 1998 Academic Press. United States, pp. 93-101.

- Georgatsou E., Mavrogiannis L.A., Fragiadakis G.S. & Alexandraki D. (1997). The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J Biol Chem*, 272, 13786-92.
- Gotz S., Garcia-Gomez J.M., Terol J., Williams T.D., Nagaraj S.H., Nueda M.J., Robles M., Talon M., Dopazo J. & Conesa A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. In: *Nucleic Acids Res England*, pp. 3420-35.
- Gralla E.B., Thiele D.J., Silar P. & Valentine J.S. (1991). ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 8558-62.
- Granger D.L., Perfect J.R. & Durack D.T. (1985). Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *J Clin Invest*, 76, 508-16.
- Graumann J., Dunipace L.A., Seol J.H., McDonald W.H., Yates J.R., Wold B.J. & Deshaies R.J. (2004). Applicability of tandem affinity purification MudPIT to pathway proteomics in yeast. *Mol Cell Proteomics*, 3, 226-37.
- Griffith C.L., Klutts J.S., Zhang L., Lavery S.B. & Doering T.L. (2004). UDP-glucose dehydrogenase plays multiple roles in the biology of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *J Biol Chem*, 279, 51669-76.
- Gross C., Kelleher M., Iyer V.R., Brown P.O. & Winge D.R. (2000). Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *J Biol Chem*, 275, 32310-6.
- Guimarães A.J., Frases S., Cordero R.J., Nimrichter L., Casadevall A. & Nosanchuk J.D. (2010). *Cryptococcus neoformans* responds to mannitol by increasing capsule size in vitro and in vivo. *Cell Microbiol*, 12, 740-53.
- Gygi S.P., Corthals G.L., Zhang Y., Rochon Y. & Aebersold R. (2000). Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 9390-5.
- Görg A., Weiss W. & Dunn M.J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4, 3665-85.
- Haas H. (2003). Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Appl Microbiol Biotechnol*, 62, 316-30.
- Hamza I. & Gitlin J.D. (2002). Copper chaperones for cytochrome c oxidase and human disease. *J Bioenerg Biomembr*, 34, 381-8.
- Han X., Aslanian A. & Yates J.R., 3rd (2008). Mass spectrometry for proteomics. In: *Curr Opin Chem Biol England*, pp. 483-90.
- Harris G.K. & Shi X. (2003). Signaling by carcinogenic metals and metal-induced reactive oxygen species. In: *Mutat Res Netherlands*, pp. 183-200.
- Hassett R. & Kosman D.J. (1995). Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 270, 128-34.
- Hentze M.W., Muckenthaler M.U. & Andrews N.C. (2004). Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. In: *Cell United States*, pp. 285-97.
- Hicks J.K., Bahn Y.S. & Heitman J. (2005). Pde1 phosphodiesterase modulates cyclic AMP levels through a protein kinase A-mediated negative feedback loop in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 4, 1971-81.

- Hicks J.K. & Heitman J. (2007). Divergence of protein kinase A catalytic subunits in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* illustrates evolutionary reconfiguration of a signaling cascade. *Eukaryot Cell*, 6, 413-20.
- Himmelblau E. & Amasino R.M. (2000). Delivering copper within plant cells. In: *Curr Opin Plant Biol* United States, pp. 205-10.
- Horn D. & Barrientos A. (2008). Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase. *IUBMB Life*, 60, 421-9.
- Hornig Y.C., Cobine P.A., Maxfield A.B., Carr H.S. & Winge D.R. (2004). Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. In: *J Biol Chem* United States, pp. 35334-40.
- Huffman D.L. & O'Halloran T.V. (2001). Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. In: *Annu Rev Biochem* United States, pp. 677-701.
- Hwang N.R., Yim S.H., Kim Y.M., Jeong J., Song E.J., Lee Y., Lee J.H., Choi S. & Lee K.J. (2009). Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular functions. In: *Biochem J* England, pp. 253-64.
- Idnurm A., Bahn Y.S., Nielsen K., Lin X., Fraser J.A. & Heitman J. (2005). Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol*, 3, 753-64.
- Ihrig J., Hausmann A., Hain A., Richter N., Hamza I., Lill R. & Mühlenhoff U. (2010). Iron regulation through the back door: iron-dependent metabolite levels contribute to transcriptional adaptation to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 9, 460-71.
- Jacobson E.S., Goodner A.P. & Nyhus K.J. (1998). Ferrous iron uptake in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 66, 4169-75.
- Jacobson E.S. & Petro M.J. (1987). Extracellular iron chelation in *Cryptococcus neoformans*. *J Med Vet Mycol*, 25, 415-8.
- James P.G. & Cherniak R. (1992). Galactoxylomannans of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 60, 1084-8.
- Janbon G., Himmelreich U., Moyrand F., Improvisi L. & Dromer F. (2001). Cas1p is a membrane protein necessary for the O-acetylation of the *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. In: *Mol Microbiol* England, pp. 453-67.
- Jensen L.T., Howard W.R., Strain J.J., Winge D.R. & Culotta V.C. (1996). Enhanced effectiveness of copper ion buffering by CUP1 metallothionein compared with CRS5 metallothionein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 271, 18514-9.
- Jensen L.T. & Winge D.R. (1998). Identification of a copper-induced intramolecular interaction in the transcription factor Mac1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 17, 5400-8.
- Jiang N., Liu X., Pan J., Wang Y. & Zhu X. (2009a). Effect of the copper-responsive factor Cuf1 on the capsule biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 49, 1459-64.
- Jiang N., Liu X., Yang J., Li Z., Pan J. & Zhu X. (2011). Regulation of copper homeostasis by Cuf1 associates with its subcellular localization in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* H99. *FEMS Yeast Res*.

- Jiang N., Sun N., Xiao D., Pan J., Wang Y. & Zhu X. (2009b). A copper-responsive factor gene CUF1 is required for copper induction of laccase in *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Lett*, 296, 84-90.
- Jobbins S.E., Hill C.J., D'Souza-Basseal J.M., Padula M.P., Herbert B.R. & Krockenberger M.B. (2010). Immunoproteomic approach to elucidating the pathogenesis of cryptococcosis caused by *Cryptococcus gattii*. *J Proteome Res*, 9, 3832-41.
- Jung W.H., Hu G., Kuo W. & Kronstad J.W. (2009). Role of ferroxidases in iron uptake and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 8, 1511-20.
- Jung W.H. & Kronstad J.W. (2008). Iron and fungal pathogenesis: a case study with *Cryptococcus neoformans*. *Cell Microbiol*, 10, 277-84.
- Jung W.H. & Kronstad J.W. (2010). The iron-responsive, GATA-type transcription factor cir1 influences mating in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cells*.
- Jung W.H., Saikia S., Hu G., Wang J., Fung C.K., D'Souza C., White R. & Kronstad J.W. (2010). HapX positively and negatively regulates the transcriptional response to iron deprivation in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog*, 6, e1001209.
- Jung W.H., Sham A., Lian T., Singh A., Kosman D.J. & Kronstad J.W. (2008). Iron source preference and regulation of iron uptake in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog*, 4, e45.
- Jung W.H., Sham A., White R. & Kronstad J.W. (2006). Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biol*, 4, e410.
- Kanehisa M. & Goto S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. In: *Nucleic Acids Res England*, pp. 27-30.
- Katsu M., Kidd S., Ando A., Moretti-Branchini M.L., Mikami Y., Nishimura K. & Meyer W. (2004). The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *FEMS Yeast Res*, 4, 377-88.
- Kidd S.E., Chow Y., Mak S., Bach P.J., Chen H., Hingston A.O., Kronstad J.W. & Bartlett K.H. (2007). Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Appl Environ Microbiol*, 73, 1433-43.
- Kidd S.E., Hagen F., Tschärke R.L., Huynh M., Bartlett K.H., Fyfe M., Macdougall L., Boekhout T., Kwon-Chung K.J. & Meyer W. (2004). A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 17258-63.
- Kim B.E., Nevitt T. & Thiele D.J. (2008). Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. In: *Nat Chem Biol United States*, pp. 176-85.
- Kline K.G. & Wu C.C. (2009). MudPIT analysis: application to human heart tissue. *Methods Mol Biol*, 528, 281-93.
- Knight S.A., Vilaire G., Lesuisse E. & Dancis A. (2005). Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. *Infect Immun*, 73, 5482-92.

- Koller A., Washburn M.P., Lange B.M., Andon N.L., Deciu C., Haynes P.A., Hays L., Schieltz D., Ulaszek R., Wei J., Wolters D. & Yates J.R. (2002). Proteomic survey of metabolic pathways in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11969-74.
- Kornitzer D. (2009). Fungal mechanisms for host iron acquisition. In: *Curr Opin Microbiol* England, pp. 377-83.
- Koster W. (2005). Cytoplasmic membrane iron permease systems in the bacterial cell envelope. *Front Biosci*, 10, 462-77.
- Kozlowski H., Janicka-Klos A., Brasun J., Gaggelli E., Valensin D. & Valensin G. (2009). Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation). *Coordination Chemistry Reviews*, 253, 2665-2685.
- Kozubowski L., Lee S.C. & Heitman J. (2009). Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. In: *Cell Microbiol* England, pp. 370-80.
- Kraus P.R., Fox D.S., Cox G.M. & Heitman J. (2003). The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. *Mol Microbiol*, 48, 1377-87.
- Krockenberger M.B., Malik R., Ngamskulrungraj P., Trilles L., Escandon P., Dowd S., Allen C., Himmelreich U., Canfield P.J., Sorrell T.C. & Meyer W. (2010). Pathogenesis of pulmonary *Cryptococcus gattii* infection: a rat model. *Mycopathologia*, 170, 315-30.
- Kronstad J.W., Attarian R., Cadieux B., Choi J., D'Souza C.A., Griffiths E.J., Geddes J.M., Hu G., Jung W.H., Kretschmer M., Saikia S. & Wang J. (2011). Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. In: *Nat Rev Microbiol* England, pp. 193-203.
- Kwon-Chung K.J. (1976). A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia*, 68, 943-6.
- Kwon-Chung K.J. & Bennett J.E. (1978). Distribution of alpha and alpha mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *Am J Epidemiol*, 108, 337-40.
- Kwon-Chung K.J. & Bennett J.E. (1984). High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, 257, 213-8.
- Kwon-Chung K.J., Edman J.C. & Wickes B.L. (1992). Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 60, 602-5.
- Kwon-Chung K.J. & Varma A. (2006). Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res*, 6, 574-87.
- Kwon-Chung K.J., Wickes B.L., Booth J.L., Vishniac H.S. & Bennett J.E. (1987). Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 55, 1751-4.
- Labbe S., Zhu Z. & Thiele D.J. (1997). Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J Biol Chem*, 272, 15951-8.
- Lalioti V., Muruais G., Tsuchiya Y., Pulido D. & Sandoval I.V. (2009). Molecular mechanisms of copper homeostasis. In: *Front Biosci* United States, pp. 4878-903.

- Lan C.Y., Rodarte G., Murillo L.A., Jones T., Davis R.W., Dungan J., Newport G. & Agabian N. (2004). Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, 53, 1451-69.
- Latouche G.N., Sorrell T.C. & Meyer W. (2002). Isolation and characterisation of the phospholipase B gene of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *FEMS Yeast Res*, 2, 551-61.
- Lee H., Chang Y.C., Varma A. & Kwon-Chung K.J. (2009). Regulatory diversity of TUP1 in *Cryptococcus neoformans*. In: *Eukaryot Cell* United States, pp. 1901-8.
- Lee J., Garrett W.M. & Cooper B. (2007). Shotgun proteomic analysis of Arabidopsis thaliana leaves. *J Sep Sci*, 30, 2225-30.
- Lengeler K.B., Fox D.S., Fraser J.A., Allen A., Forrester K., Dietrich F.S. & Heitman J. (2002). Mating-type locus of *Cryptococcus neoformans*: a step in the evolution of sex chromosomes. *Eukaryot Cell*, 1, 704-18.
- Lester S.J., Malik R., Bartlett K.H. & Duncan C.G. (2011). Cryptococcosis: update and emergence of *Cryptococcus gattii*. *Vet Clin Pathol*.
- Leung K., Dacks J. & Field M. (2008). Evolution of the Multivesicular Body ESCRT Machinery; Retention across the Eukaryotic lineage. *Traffic*, 9, 1-18.
- Levitz S.M. & Specht C.A. (2006). The molecular basis for the immunogenicity of *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. *FEMS Yeast Res*, 6, 513-24.
- Leão C.A., Ferreira-Paim K., Andrade-Silva L., Mora D.J., da Silva P.R., Machado A.S., Das Neves P.F., Pena G.S., de Almeida Teixeira L.S. & Silva-Vergara M.L. (2010). Primary cutaneous cryptococcosis caused by *Cryptococcus gattii* in an immunocompetent host. *Med Mycol*.
- Lian T., Simmer M.I., D'Souza C.A., Steen B.R., Zuyderduyn S.D., Jones S.J., Marra M.A. & Kronstad J.W. (2005). Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, 55, 1452-72.
- Lill R. & Muhlenhoff U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem*, 77, 669-700.
- Lim H., Eng J., Yates J.R., 3rd, Tollaksen S.L., Giometti C.S., Holden J.F., Adams M.W., Reich C.I., Olsen G.J. & Hays L.G. (2003). Identification of 2D-gel proteins: a comparison of MALDI/TOF peptide mass mapping to mu LC-ESI tandem mass spectrometry. In: *J Am Soc Mass Spectrom* United States, pp. 957-70.
- Lin X. & Heitman J. (2006). The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol*, 60, 69-105.
- Link A., Eng J., Schieltz D., Carmack E., Mize G., Morris D., Garvik B. & Yates J.r. (1999). Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol*, 7, 676-682.
- Linz R. & Lutsenko S. (2007). Copper-transporting ATPases ATP7A and ATP7B: cousins, not twins. *J Bioenerg Biomembr*, 39, 403-7.
- Litvintseva A.P., Thakur R., Reller L.B. & Mitchell T.G. (2005). Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. In: *J Infect Dis* United States, pp. 888-92.
- Loftus B., Fung E., Roncaglia P., Rowley D., Amedeo P., Bruno D., Vamathevan J., Miranda M., Anderson I., Fraser J., Allen J., Bosdet I., Brent M., Chiu R., Doering

- T., Donlin M., D'Souza C., Fox D., Grinberg V., Fu J., Fukushima M., Haas B., Huang J., Janbon G., Jones S., Koo H., Krzywinski M., Kwon-Chung J., Lengeler K., Maiti R., Marra M., Marra R., Mathewson C., Mitchell T., Perlea M., Riggs F., Salzberg S., Schein J., Shvartsbeyn A., Shin H., Shumway M., Specht C., Suh B., Tenney A., Utterback T., Wickes B., Wortman J., Wye N., Kronstad J., Lodge J., Heitman J., Davis R., Fraser C. & Hyman R. (2005). The Genome of the Basidiomycetous Yeast and Human Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*, 307, 1321-1324.
- Ma H., Croudace J.E., Lammas D.A. & May R.C. (2006). Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. *Curr Biol*, 16, 2156-60.
- Ma H., Hagen F., Stekel D.J., Johnston S.A., Sionov E., Falk R., Polacheck I., Boekhout T. & May R.C. (2009). The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 12980-5.
- Ma H. & May R.C. (2009). Virulence in *Cryptococcus* species. *Adv Appl Microbiol*, 67, 131-90.
- Ma H. & May R.C. (2010). Mitochondria and the regulation of hypervirulence in the fatal fungal outbreak on Vancouver Island. *Virulence*, 1, 197-201.
- MacDougall L. & Fyfe M. (2006). Emergence of *Cryptococcus gattii* in a novel environment provides clues to its incubation period. *J Clin Microbiol*, 44, 1851-2.
- MacDougall L., Kidd S.E., Galanis E., Mak S., Leslie M.J., Cieslak P.R., Kronstad J.W., Morshed M.G. & Bartlett K.H. (2007). Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerg Infect Dis*, 13, 42-50.
- Maeng S., Ko Y.J., Kim G.B., Jung K.W., Floyd A., Heitman J. & Bahn Y.S. (2010). Comparative transcriptome analysis reveals novel roles of the Ras and cyclic AMP signaling pathways in environmental stress response and antifungal drug sensitivity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 9, 360-78.
- Mak S., Klinkenberg B., Bartlett K. & Fyfe M. (2010). Ecological niche modeling of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada. *Environ Health Perspect*, 118, 653-8.
- Mansour M.K., Schlesinger L.S. & Levitz S.M. (2002). Optimal T cell responses to *Cryptococcus neoformans* mannoprotein are dependent on recognition of conjugated carbohydrates by mannose receptors. *J Immunol*, 168, 2872-9.
- Martinez L.R., Garcia-Rivera J. & Casadevall A. (2001). *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains. *J Clin Microbiol*, 39, 3365-7.
- Masse E., Salvail H., Desnoyers G. & Arguin M. (2007). Small RNAs controlling iron metabolism. In: *Curr Opin Microbiol* England, pp. 140-5.
- Mauri P. & Dehò G. (2008). A proteomic approach to the analysis of RNA degradosome composition in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*, 447, 99-117.
- McDonald W.H., Tabb D.L., Sadygov R.G., MacCoss M.J., Venable J., Graumann J., Johnson J.R., Cociorva D. & Yates J.R. (2004). MS1, MS2, and SQT-three unified, compact, and easily parsed file formats for the storage of shotgun proteomic spectra and identifications. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 18, 2162-8.

- McFadden D.C., De Jesus M. & Casadevall A. (2006). The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. *J Biol Chem*, 281, 1868-75.
- McFadden D.C., Fries B.C., Wang F. & Casadevall A. (2007). Capsule structural heterogeneity and antigenic variation in *Cryptococcus neoformans*. In: *Eukaryot Cell* United States, pp. 1464-73.
- Meyer W., Aanensen D.M., Boekhout T., Cogliati M., Diaz M.R., Esposto M.C., Fisher M., Gilgado F., Hagen F., Kaocharoen S., Litvintseva A.P., Mitchell T.G., Simwami S.P., Trilles L., Viviani M.A. & Kwon-Chung J. (2009). Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol*, 47, 561-70.
- Meyer W., Castañeda A., Jackson S., Huynh M., Castañeda E. & Group I.C.S. (2003). Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*, 9, 189-95.
- Missall T.A., Moran J.M., Corbett J.A. & Lodge J.K. (2005). Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant Tsa1. In: *Eukaryot Cell* United States, pp. 202-8.
- Mitchell D.H., Sorrell T.C., Allworth A.M., Heath C.H., McGregor A.R., Papanoum K., Richards M.J. & Gottlieb T. (1995). Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. *Clin Infect Dis*, 20, 611-6.
- Mogensen E.G., Janbon G., Chaloupka J., Steegborn C., Fu M.S., Moyrand F., Klengel T., Pearson D.S., Geeves M.A., Buck J., Levin L.R. & Mühlischlegel F.A. (2006). *Cryptococcus neoformans* senses CO₂ through the carbonic anhydrase Can2 and the adenylyl cyclase Cac1. *Eukaryot Cell*, 5, 103-11.
- Morgan J., McCarthy K.M., Gould S., Fan K., Arthington-Skaggs B., Iqbal N., Stamey K., Hajjeh R.A. & Brandt M.E. (2006). *Cryptococcus gattii* infection: characteristics and epidemiology of cases identified in a South African province with high HIV seroprevalence, 2002-2004. In: *Clin Infect Dis* United States, pp. 1077-80.
- Motoyama A. & Yates J.R., 3rd (2008). Multidimensional LC separations in shotgun proteomics. *Anal Chem*, 80, 7187-93.
- Moyrand F. & Janbon G. (2004). UGD1, encoding the *Cryptococcus neoformans* UDP-glucose dehydrogenase, is essential for growth at 37 degrees C and for capsule biosynthesis. *Eukaryot Cell*, 3, 1601-8.
- Muyembe Tamfum J.J., Mupapa Kibadi D., Nganda L., Ngwala-Bikindu D., Kuezina T., Kela-We I. & Vandepitte J. (1992). [Cryptococcosis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *Gattii*. A case associated with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in Kinshasa, Zaire]. *Med Trop (Mars)*, 52, 435-8.
- Narasipura S.D., Ault J.G., Behr M.J., Chaturvedi V. & Chaturvedi S. (2003). Characterization of Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: role in biology and virulence. *Mol Microbiol*, 47, 1681-94.
- Narasipura S.D., Chaturvedi V. & Chaturvedi S. (2005). Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two

- superoxide dismutases in fungal biology and virulence. In: *Mol Microbiol* England, pp. 1782-800.
- Ngamskulrungrroj P., Gilgado F., Faganello J., Litvintseva A.P., Leal A.L., Tsui K.M., Mitchell T.G., Vainstein M.H. & Meyer W. (2009a). Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. *PLoS One*, 4, e5862.
- Ngamskulrungrroj P., Himmelreich U., Breger J.A., Wilson C., Chayakulkeeree M., Krockenberger M.B., Malik R., Daniel H.M., Toffaletti D., Djordjevic J.T., Mylonakis E., Meyer W. & Perfect J.R. (2009b). The trehalose synthesis pathway is an integral part of the virulence composite for *Cryptococcus gattii*. *Infect Immun*, 77, 4584-96.
- Ngamskulrungrroj P., Price J., Sorrell T., Perfect J.R. & Meyer W. (2011). *Cryptococcus gattii* Virulence Composite: Candidate Genes Revealed by Microarray Analysis of High and Less Virulent Vancouver Island Outbreak Strains. *PLoS One*, 6, e16076.
- Ngamskulrungrroj P., Serena C., Gilgado F., Malik R. & Meyer W. (2010). Global VGIIa isolates are of comparable virulence to the major fatal *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype. *Clin Microbiol Infect*.
- Nicol A.M., Hurrell C., McDowall W., Bartlett K. & Elmieh N. (2008). Communicating the risks of a new, emerging pathogen: the case of *Cryptococcus gattii*. *Risk Anal*, 28, 373-86.
- Nielsen K., Cox G.M., Wang P., Toffaletti D.L., Perfect J.R. & Heitman J. (2003). Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and virulence of congenic α and α isolates. *Infect Immun*, 71, 4831-41.
- Niessen S., Mcleod I. & Yates J.r. (2006). Silver Staining, Digestion, and Extraction of Peptides from an Acrylamide Gel for MS Analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*.
- Nose Y., Rees E.M. & Thiele D.J. (2006). Structure of the Ctr1 copper trans'PORE'ter reveals novel architecture. In: *Trends Biochem Sci* England, pp. 604-7.
- Nyhus K. & Jacobson E.S. (2004). Oxy2 as a transcriptional activator gene for copper uptake in *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol*, 42, 325-31.
- Nyhus K.J., Wilborn A.T. & Jacobson E.S. (1997). Ferric iron reduction by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 65, 434-8.
- O'Farrell P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 250, 4007-21.
- O'Meara T.R., Norton D., Price M.S., Hay C., Clements M.F., Nichols C.B. & Alspaugh J.A. (2010). Interaction of *Cryptococcus neoformans* Rim101 and protein kinase A regulates capsule. *PLoS Pathog*, 6, e1000776.
- Odom A., Muir S., Lim E., Toffaletti D.L., Perfect J. & Heitman J. (1997). Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J*, 16, 2576-89.
- Ogur M., St. John R. & Nagai S. (1957). Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast. *Science*, 125, 928-9.
- Oliveira M.C., Hirata I.Y., Chagas J.R., Boschcov P., Gomes R.A., Figueiredo A.F. & Juliano L. (1992). Intramolecularly quenched fluorogenic peptide substrates for human renin. In: *Anal Biochem* United States, pp. 39-46.
- Ozer A. & Bruick R.K. (2007). Non-heme dioxygenases: cellular sensors and regulators jelly rolled into one? In: *Nat Chem Biol* United States, pp. 144-53.

- Palmer C.M. & Guerinot M.L. (2009). Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat Chem Biol*, 5, 333-340.
- Palmiter R.D. (1998). The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 8428-30.
- Pena M.M., Lee J. & Thiele D.J. (1999). A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr*, 129, 1251-60.
- Pena M.M., Puig S. & Thiele D.J. (2000). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J Biol Chem*, 275, 33244-51.
- Perfect J.R. (2005). *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 45, 395-404.
- Pfeiffer T.J. & Ellis D.H. (1992). Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from Eucalyptus tereticornis. *J Med Vet Mycol*, 30, 407-8.
- Philpott C.C. (2006). Iron uptake in fungi: a system for every source. In: *Biochim Biophys Acta Netherlands*, pp. 636-45.
- Philpott C.C. & Protchenko O. (2008). Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 7, 20-7.
- Philpott C.C., Protchenko O., Kim Y.W., Boretsky Y. & Shakoury-Elizeh M. (2002). The response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of siderophore-based systems of iron uptake. *Biochem Soc Trans*, 30, 698-702.
- Pieper R., Huang S.T., Parmar P.P., Clark D.J., Alami H., Fleischmann R.D., Perry R.D. & Peterson S.N. (2010). Proteomic analysis of iron acquisition, metabolic and regulatory responses of *Yersinia pestis* to iron starvation. In: *BMC Microbiol England*, p. 30.
- Portnoy M.E., Schmidt P.J., Rogers R.S. & Culotta V.C. (2001). Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics*, 265, 873-82.
- Protchenko O. & Philpott C.C. (2003). Regulation of intracellular heme levels by HMX1, a homologue of heme oxygenase, in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *J Biol Chem United States*, pp. 36582-7.
- Pufahl R.A., Singer C.P., Peariso K.L., Lin S.J., Schmidt P.J., Fahrni C.J., Culotta V.C., Penner-Hahn J.E. & O'Halloran T.V. (1997). Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science*, 278, 853-6.
- Puig S., Vergara S.V. & Thiele D.J. (2008). Cooperation of two mRNA-binding proteins drives metabolic adaptation to iron deficiency. In: *Cell Metab United States*, pp. 555-64.
- Pukkila-Worley R., Gerrald Q.D., Kraus P.R., Boily M.J., Davis M.J., Giles S.S., Cox G.M., Heitman J. & Alspaugh J.A. (2005). Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. *Eukaryot Cell*, 4, 190-201.
- Radtke A. & O'Riordan M. (2006). Intracellular innate resistance to bacterial pathogens. *Cell Microbiol*, 8, 1720-1729.
- Rae T.D., Schmidt P.J., Pufahl R.A., Culotta V.C. & O'Halloran T.V. (1999). Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, 284, 805-8.
- Raguzzi F., Lesuisse E. & Crichton R.R. (1988). Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 231, 253-8.

- Rakesh V., Schweitzer A.D., Zaragoza O., Bryan R., Wong K., Datta A., Casadevall A. & Dadachova E. (2008). Finite-element model of interaction between fungal polysaccharide and monoclonal antibody in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *J Phys Chem B*, 112, 8514-22.
- Ramanan N. & Wang Y. (2000). A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science*, 288, 1062-4.
- Ratledge C. (2007). Iron metabolism and infection. *Food Nutr Bull*, 28, S515-23.
- Ratledge C. & Dover L.G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. In: *Annu Rev Microbiol* United States, pp. 881-941.
- Rees E.M., Lee J. & Thiele D.J. (2004). Mobilization of intracellular copper stores by the *ctr2* vacuolar copper transporter. In: *J Biol Chem* United States, pp. 54221-9.
- Rees E.M. & Thiele D.J. (2004). From aging to virulence: forging connections through the study of copper homeostasis in eukaryotic microorganisms. In: *Curr Opin Microbiol* England, pp. 175-84.
- Rees E.M. & Thiele D.J. (2007). Identification of a vacuole-associated metalloreductase and its role in *Ctr2*-mediated intracellular copper mobilization. In: *J Biol Chem* United States, pp. 21629-38.
- Ren P., Springer D.J., Behr M.J., Samsonoff W.A., Chaturvedi S. & Chaturvedi V. (2006). Transcription factor STE12alpha has distinct roles in morphogenesis, virulence, and ecological fitness of the primary pathogenic yeast *Cryptococcus gattii*. *Eukaryot Cell*, 5, 1065-80.
- Rosa e Silva L.K., Staats C.C., Goulart L.S., Morello L.G., Pelegrinelli Fungaro M.H., Schrank A. & Vainstein M.H. (2008). Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. *Res Microbiol*, 159, 221-9.
- Rustici G., van Bakel H., Lackner D.H., Holstege F.C., Wijmenga C., Bähler J. & Brazma A. (2007). Global transcriptional responses of fission and budding yeast to changes in copper and iron levels: a comparative study. *Genome Biol*, 8, R73.
- Rutherford J.C. & Bird A.J. (2004). Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell*, 3, 1-13.
- Rutherford J.C., Jaron S. & Winge D.R. (2003). Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements. In: *J Biol Chem* United States, pp. 27636-43.
- Saitoh Y., Izumitsu K., Morita A. & Tanaka C. (2010). A copper-transporting ATPase BcCCC2 is necessary for pathogenicity of *Botrytis cinerea*. *Mol Genet Genomics*, 284, 33-43.
- Santangelo R., Zoellner H., Sorrell T., Wilson C., Donald C., Djordjevic J., Shounan Y. & Wright L. (2004). Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. *Infect Immun*, 72, 2229-39.
- Schaible U.E. & Kaufmann S.H. (2004). Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol*, 2, 946-53.
- Schmidt P.J., Ramos-Gomez M. & Culotta V.C. (1999). A gain of superoxide dismutase (SOD) activity obtained with CCS, the copper metallochaperone for SOD1. *J Biol Chem*, 274, 36952-6.

- Seo I.Y., Jeong H.J., Yun K.J. & Rim J.S. (2006). Granulomatous cryptococcal prostatitis diagnosed by transrectal biopsy. *Int J Urol*, 13, 638-9.
- Serrano R., Bernal D., Simon E. & Arino J. (2004). Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. In: *J Biol Chem* United States, pp. 19698-704.
- Shakoury-Elizeh M., Protchenko O., Berger A., Cox J., Gable K., Dunn T.M., Prinz W.A., Bard M. & Philpott C.C. (2010). Metabolic response to iron deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 285, 14823-33.
- Shakoury-Elizeh M., Tiedeman J., Rashford J., Ferea T., Demeter J., Garcia E., Rolfes R., Brown P.O., Botstein D. & Philpott C.C. (2004). Transcriptional remodeling in response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 15, 1233-43.
- Sharma P.K., Mittal N., Deswal S. & Roy N. (2010). Calorie restriction up-regulates iron and copper transport genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biosyst*.
- Shi M., Li S.S., Zheng C., Jones G.J., Kim K.S., Zhou H., Kubes P. & Mody C.H. (2010). Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. In: *J Clin Invest* United States, pp. 1683-93.
- Shoshan-Barmatz V., De Pinto V., Zweckstetter M., Raviv Z., Keinan N. & Arbel N. (2010). VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. In: *Mol Aspects Med* England, pp. 227-85.
- Silva M., Schrank A., Bailão E.F., Bailão A.M., Borges C.L., Staats C.C., Parente J.A., Pereira M., Salem-Izacc S.M., Mendes-Giannini M.J.S., Zancopé-Oliveira R.M., Rosa e Silva L.K., Nosanchuk J.D., Vainstein M.H. & Soares C.M. (2011). The homeostasis of iron, copper and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii*: A comparative analysis. *Frontiers in Microbiology*, 2, 1 - 15.
- Singh A., Kaur N. & Kosman D.J. (2007). The metallo-reductase Fre6p in Fe-efflux from the yeast vacuole. In: *J Biol Chem* United States, pp. 28619-26.
- Skaar E.P. (2010). The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathog*, 6.
- Snel B., Lehmann G., Bork P. & Huynen M.A. (2000). STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Res*, 28, 3442-4.
- Solioz M., Abicht H.K., Mermod M. & Mancini S. (2010). Response of gram-positive bacteria to copper stress. *J Biol Inorg Chem*, 15, 3-14.
- Sorrell T.C. (2001). *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol*, 39, 155-68.
- Sorrell T.C., Brownlee A.G., Ruma P., Malik R., Pfeiffer T.J. & Ellis D.H. (1996). Natural environmental sources of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol*, 34, 1261-3.
- Souza M.B., Melo C.S., Silva C.S., Santo R.M. & Matayoshi S. (2006). [Palpebral cryptococcosis: case report]. *Arq Bras Oftalmol*, 69, 265-7.
- Specht C.A., Nong S., Dan J.M., Lee C.K. & Levitz S.M. (2007). Contribution of glycosylation to T cell responses stimulated by recombinant *Cryptococcus neoformans* mannoprotein. In: *J Infect Dis* United States, pp. 796-800.

- Speed B. & Dunt D. (1995). Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Infect Dis*, 21, 28-34; discussion 35-6.
- Springer D.J. & Chaturvedi V. (2010). Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. *Emerg Infect Dis*, 16, 14-20.
- Stearman R., Yuan D.S., Yamaguchi-Iwai Y., Klausner R.D. & Dancis A. (1996). A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science*, 271, 1552-7.
- Steen B.R., Lian T., Zuyderduyn S., MacDonald W.K., Marra M., Jones S.J. & Kronstad J.W. (2002). Temperature-regulated transcription in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genome Res*, 12, 1386-400.
- Steenbergen J.N. & Casadevall A. (2003). The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. In: *Microbes Infect France*, pp. 667-75.
- Steinebrunner I., Landschreiber M., Krause-Buchholz U., Teichmann J. & Rodel G. (2011). HCC1, the Arabidopsis homologue of the yeast mitochondrial copper chaperone SCO1, is essential for embryonic development. In: *J Exp Bot England*, pp. 319-30.
- Stoj C. & Kosman D.J. (2003). Cuprous oxidase activity of yeast Fet3p and human ceruloplasmin: implication for function. In: *FEBS Lett Netherlands*, pp. 422-6.
- Sutak R., Lesuisse E., Tachezy J. & Richardson D.R. (2008). Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. *Trends Microbiol*, 16, 261-8.
- Szczyepka M.S., Zhu Z., Silar P. & Thiele D.J. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* mutants altered in vacuole function are defective in copper detoxification and iron-responsive gene transcription. In: *Yeast England*, pp. 1423-35.
- Tabb D.L., McDonald W.H. & Yates J.R., 3rd (2002). DTASelect and Contrast: tools for assembling and comparing protein identifications from shotgun proteomics. *J Proteome Res*, 1, 21-6.
- Tangen K.L., Jung W.H., Sham A.P., Lian T. & Kronstad J.W. (2007). The iron- and cAMP-regulated gene SIT1 influences ferrioxamine B utilization, melanization and cell wall structure in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 153, 29-41.
- Thiele D.J. (1988). ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Mol Cell Biol*, 8, 2745-52.
- Toffaletti D.L., Del Poeta M., Rude T.H., Dietrich F. & Perfect J.R. (2003). Regulation of cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1) expression in *Cryptococcus neoformans* by temperature and host environment. *Microbiology*, 149, 1041-9.
- Torres-Rodríguez J.M., Alvarado-Ramírez E. & Gutiérrez-Gallego R. (2008). [Urease activity in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*]. *Rev Iberoam Micol*, 25, 27-31.
- Tucker S. & Casadevall A. (2002). Replication of *Cryptococcus neoformans* in macropha... [Proc Natl Acad Sci U S A. 2002] - PubMed result. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3165-3170.
- Turski M.L. & Thiele D.J. (2009). New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling, and disease. In: *J Biol Chem United States*, pp. 717-21.

- Urbanowski J. & Piper R. (1999). The iron transporter Fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane. *J Biol Chem*, 274, 38061 - 38070.
- Valentine J.S. & Gralla E.B. (1997). Delivering copper inside yeast and human cells. *Science*, 278, 817-8.
- van Bakel H., Strengman E., Wijmenga C. & Holstege F.C. (2005). Gene expression profiling and phenotype analyses of *S. cerevisiae* in response to changing copper reveals six genes with new roles in copper and iron metabolism. In: *Physiol Genomics United States*, pp. 356-67.
- van Duin D., Casadevall A. & Nosanchuk J.D. (2002). Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 3394-400.
- Van Ho A., Ward D. & Kaplan J. (2002). TRANSITION METAL TRANSPORT IN YEAST. *Annual Review of Microbiology*, 56, 237-261.
- Vartivarian S.E., Anaissie E.J., Cowart R.E., Sprigg H.A., Tingler M.J. & Jacobson E.S. (1993). Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *J Infect Dis*, 167, 186-90.
- Vecchiarelli A., Pietrella D., Lupo P., Bistoni F., McFadden D.C. & Casadevall A. (2003). The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation. *J Leukoc Biol*, 74, 370-8.
- Vidakovics M.L., Paba J., Lamberti Y., Ricart C.A., de Sousa M.V. & Rodriguez M.E. (2007). Profiling the *Bordetella pertussis* proteome during iron starvation. *J Proteome Res*, 6, 2518-28.
- Vulpe C.D., Kuo Y.M., Murphy T.L., Cowley L., Askwith C., Libina N., Gitschier J. & Anderson G.J. (1999). Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet*, 21, 195-9.
- Waldron K.J., Rutherford J.C., Ford D. & Robinson N.J. (2009). Metalloproteins and metal sensing. In: *Nature England*, pp. 823-30.
- Walton F.J., Idnurm A. & Heitman J. (2005). Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. In: *Mol Microbiol England*, pp. 1381-96.
- Wang P., Cardenas M.E., Cox G.M., Perfect J.R. & Heitman J. (2001). Two cyclophilin A homologs with shared and distinct functions important for growth and virulence of *Cryptococcus neoformans*. In: *EMBO Rep England*, pp. 511-8.
- Wang P. & Heitman J. (2005). The cyclophilins. *Genome Biol*, 6, 226.
- Wang Y., Aisen P. & Casadevall A. (1995). *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect Immun*, 63, 3131-6.
- Wang Y. & Casadevall A. (1994). Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. *Infect Immun*, 62, 3004-7.
- Washburn M.P., Ulaszek R.R. & Yates J.R. (2003). Reproducibility of quantitative proteomic analyses of complex biological mixtures by multidimensional protein identification technology. *Anal Chem*, 75, 5054-61.
- Washburn M.P., Wolters D. & Yates J.R. (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol*, 19, 242-7.

- Waterman S.R., Hacham M., Hu G., Zhu X., Park Y.D., Shin S., Panepinto J., Valyi-Nagy T., Beam C., Husain S., Singh N. & Williamson P.R. (2007). Role of a CUF1/CTR4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest*, 117, 794-802.
- Waugh M.S., Nichols C.B., DeCesare C.M., Cox G.M., Heitman J. & Alspaugh J.A. (2002). Ras1 and Ras2 contribute shared and unique roles in physiology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 148, 191-201.
- Weatherhead S.C., Charlton F.G. & Reynolds N.J. (2006). Plaques, papules, and nodules in a 40-year-old man. *Arch Dermatol*, 142, 921-6.
- Wegner S.V., Arslan H., Sunbul M., Yin J. & He C. (2010). Dynamic copper(I) imaging in mammalian cells with a genetically encoded fluorescent copper(I) sensor. *J Am Chem Soc*, 132, 2567-9.
- Weinberg E.D. (2004). Suppression of bacterial biofilm formation by iron limitation. *Med Hypotheses*, 63, 863-5.
- Wickes B.L., Mayorga M.E., Edman U. & Edman J.C. (1996). Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the alpha-mating type. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 7327-31.
- Williamson P.R., Wakamatsu K. & Ito S. (1998). Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol*, 180, 1570-2.
- Wills E.A., Roberts I.S., Del Poeta M., Rivera J., Casadevall A., Cox G.M. & Perfect J.R. (2001). Identification and characterization of the *Cryptococcus neoformans* phosphomannose isomerase-encoding gene, MAN1, and its impact on pathogenicity. *Mol Microbiol*, 40, 610-20.
- Wolschendorf F., Ackart D., Shrestha T.B., Hascall-Dove L., Nolan S., Lamichhane G., Wang Y., Bossmann S.H., Basaraba R.J. & Niederweis M. (2011). Copper resistance is essential for virulence of Mycobacterium tuberculosis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A United States*, pp. 1621-6.
- Wolters D.A., Washburn M.P. & Yates J.R. (2001). An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem*, 73, 5683-90.
- Wright L.C., Payne J., Santangelo R.T., Simpanya M.F., Chen S.C., Widmer F. & Sorrell T.C. (2004a). Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*. In: *Biochem J England*, pp. 377-84.
- Wright L.C., Payne J., Santangelo R.T., Simpanya M.F., Chen S.C., Widmer F. & Sorrell T.C. (2004b). Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*. *Biochem J*, 384, 377-84.
- Wu C.C., MacCoss M.J., Mardones G., Finnigan C., Mogelsvang S., Yates J.R. & Howell K.E. (2004). Organellar proteomics reveals Golgi arginine dimethylation. *Mol Biol Cell*, 15, 2907-19.
- Yamaguchi-Iwai Y., Dancis A. & Klausner R.D. (1995). AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 14, 1231-9.
- Yamaguchi-Iwai Y., Serpe M., Haile D., Yang W., Kosman D.J., Klausner R.D. & Dancis A. (1997). Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of

- MAC1 protein to upstream regulatory sequences of FRE1 and CTR1. *J Biol Chem*, 272, 17711-8.
- Yates J.R., 3rd (2004). Mass spectral analysis in proteomics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 33, 297-316.
- Yates J.R., Ruse C.I. & Nakorchevsky A. (2009). Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng*, 11, 49-79.
- Yonkovich J., McKendry R., Shi X. & Zhu Z. (2002). Copper ion-sensing transcription factor Mac1p post-translationally controls the degradation of its target gene product Ctr1p. In: *J Biol Chem United States*, pp. 23981-4.
- Yuan D.S., Stearman R., Dancis A., Dunn T., Beeler T. & Klausner R.D. (1995). The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 2632-6.
- Zaragoza O., Fries B.C. & Casadevall A. (2003). Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂. *Infect Immun*, 71, 6155-64.
- Zaragoza O., Rodrigues M.L., De Jesus M., Frases S., Dadachova E. & Casadevall A. (2009). The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol*, 68, 133-216.
- Zhu C., Jiang N., Xiao D., Pan J. & Zhu X. (2010). Chloride channel-dependent copper acquisition of laccase in the basidiomycetous fungus *Cryptococcus neoformans*. *Sci China Life Sci*, 53, 125-30.
- Zhu X., Gibbons J., Zhang S. & Williamson P.R. (2003). Copper-mediated reversal of defective laccase in a Deltavph1 avirulent mutant of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, 47, 1007-14.
- Zhu X. & Williamson P.R. (2003). A CLC-type chloride channel gene is required for laccase activity and virulence in *Cryptococcus neoformans*. In: *Mol Microbiol England*, pp. 1271-81.
- Zhu X. & Williamson P.R. (2004). Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res*, 5, 1-10.
- Zybailov B., Mosley A.L., Sardi M.E., Coleman M.K., Florens L. & Washburn M.P. (2006). Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Proteome Res*, 5, 2339-47.