

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ASSOCIADAS A
MUTAÇÃO DE TROPOMIOSINA EM *Cryptococcus gattii***

Dissertação de Mestrado

Elisa Simon

Porto Alegre, 2012.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ASSOCIADAS A
MUTAÇÃO DE TROPOMIOSINA EM *Cryptococcus gattii***

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

Elisa Simon

Orientação: Prof^a. Dr^a. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, 2012.

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

Apoio: CAPES, CNPq e FINEP.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades.....	V
Lista de Figuras	VI
Lista de Tabelas	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Aspectos gerais.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Citoesqueleto	12
2.2 Tropomiosina	17
2.3 O complexo Cryptococcus	19
2.4 Criptococose.....	21
2.5 Virulência.....	22
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. MANUSCRITO	28
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

aa - Aminoácidos
Ab - Anticorpo
bp - Pares de bases
BSA - *Bovine serum albumin*
°C - Graus Celsius
CFU - Unidades formadoras de colônia
CFW - *Calcofluor white*
DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*
DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's medium*
DNA - Ácido desoxirribonucléico
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
FITC - *Fluorescein isothiocyanate*
GalXM - Galactoxilomanana
GlcNAc - Glicosil-N-Acetilcisteína
GXM - Glicuronoxilomanana
h - Hora
IgG - Imunoglobulina G
Kb - Quilobases
LB - Luria-Bertani
M - Molar
mg - Miligramas
ml - Mililitros
min - minutos
mM - Milimolar
OD₆₀₀ - *Optical density*
PBS - *Phosphate buffered saline*
PCR - Reação em Cadeia de Polimerase
pH - Potencial de hidrogênio iônico
sp. - Espécie
Tpm1 - Tropomiosina
U - Unidades
μM - Micromolar
μL - Microlitros
μg - Microgramas
WGA - *Lectin wheat germ agglutinin*
WT - Tipo selvagem
YPD - *Yeast extract, peptone, dextrose*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> regulado pelo citoesqueleto de actina.....	14
Figura 2. Modelo para desenvolvimento dos pontos de actina.....	15
Figura 3. Sorotipos e genótipos de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	20
Figura 4. Ciclo de infecção de <i>Cryptococcus</i>	22
Figure 1. Serial dilutions and micrographs of <i>C. gattii</i> morphology after 48 hours of growth are presented for WT and <i>tpm1Δ</i>	46
Figure 2. Nuclear defects in hyperelongated <i>tpm1</i> null mutant cells.	47
Figure 3. <i>C. gattii</i> cell wall and actin organization.	48
Figure 4. TPM1 is required for normal GXM secretion and capsule assembly.	49
Figure 5. Virulence of <i>C. gattii</i> was affected by TPM1 deletion.	50

LISTA DE TABELAS

TABLE 1. List of oligonucleotides used in this study.	51
--	----

RESUMO

Processos celulares, incluindo crescimento celular, transporte de organelas, endocitose, exocitose e citocinese requerem um citoesqueleto intacto. A tropomiosina (Tpm1) é uma proteína dimérica de citoesqueleto altamente conservada, que forma polímeros que se associam aos filamentos de F-actina em células musculares e não musculares. Essa ligação estabiliza os filamentos de actina evitando a despolimerização por outros fatores. Assim, a tropomiosina desempenha um papel fundamental na integridade celular e também permite que processos como secreção, localização e função de muitas proteínas sejam exercidas, de acordo com a demanda celular exigida em diferentes situações. Em leveduras, Tpm1 participa da manutenção destes processos, assim como na integridade celular e morfologia da célula. Neste estudo, uma análise do gene que codifica para tropomiosina e a funcionalidade do produto codificado por ele foi realizada para a levedura *Cryptococcus gattii*. Foi realizada a construção de uma linhagem mutante de tropomiosina, que revelou que Tpm1 está envolvida na formação da cápsula polissacarídica, morfologia e virulência do fungo. Mutação no gene de Tpm1 leva a alterações no citoesqueleto celular, crescimento e morfologia, e, defeitos de citocinese. Estes resultados indicam um papel crucial para Tpm1 na formação de cápsula polissacarídica, morfologia e virulência de *C. gattii*.

ABSTRACT

Cellular processes including cell growth, organelle transport, endocytosis, exocytosis and cytokinesis require an intact cytoskeleton. Tropomyosin (Tpm1) is a dimeric protein of the highly conserved cytoskeleton forming polymers which are associated with the F-actin filaments in muscle and non-muscle cells. This binding stabilizes actin filaments preventing depolymerization by other factors. Thus, tropomyosin plays a key role in cellular integrity and also allows processes such as secretion, localization and function of many proteins to be performed according to the required cellular demand in different situations. In yeasts, Tpm1 participates in the integrity of these processes, cell integrity and cell morphology. Tropomyosin also plays an important role in the secretion, localization, and function of many proteins, in fungi. In this study we performed a construction of a *Cryptococcus gattii* tropomyosin mutant strain, which revealed that disruption of *C. gattii* tropomyosin gene leads to changes in cytoskeleton, abnormal growth and morphology, defective cell separation, assembly of the polysaccharide capsule and virulence. Taken together, these results indicate a central role for Tpm1 in the assembly of the polysaccharide capsule, morphology and virulence of *C. gattii*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

As leveduras patogênicas do complexo *Cryptococcus* sp., *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são os agentes etiológicos da criptococose, doença pulmonar e cerebral, causadora de quadros graves de meningoencefalite (Casadevall & Perfect, 1998; Perfect & Casadevall, 2002, Jain *et al.*, 2006). Distintos fatores de virulência vêm sendo amplamente estudados nas espécies *Cryptococcus* como a produção do pigmento melanina, a síntese de uma cápsula polissacarídica e a habilidade de crescimento a 37°C (Lin & Heitman, 2006; Ma & May, 2009). Uma importante característica que leva o fungo a causar doença é sua habilidade de crescimento em diferentes ambientes e situações dentro do seu hospedeiro (Feldmesser *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2008). Ambientes alcalinos e neutros são encontrados extracelularmente, como no espaço alveolar e sangue, enquanto que ambientes ácidos são caracteristicamente encontrados intracelularmente, dentro de fagolisossomos das células fagocíticas do hospedeiro (Feldmesser *et al.*, 2001). No entanto, para sobreviver a alterações de pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes, microrganismos dispõem de rápidos processos morfogenéticos para manter ou alterar seu tamanho, forma e volume celular (Ballou *et al.*, 2010).

C. neoformans e *C. gattii* são patógenos intracelulares facultativos capazes de sobreviver e se replicar dentro de células fagocíticas, podendo se

mover para dentro e para fora dessas células, o que confere à levedura a capacidade de se disseminar pelo organismo e se proteger da resposta imune do seu hospedeiro (Feldmesser *et al.*, 2000; Toker & Casadevall, 2002; Del Poeta, 2004; Alvarez & Casadevall, 2006; Ma & May, 2006). *Cryptococcus* sp. necessita de uma constante adaptação aos novos ambientes no hospedeiro, e para isso, mudanças na organização de diferentes compartimentos celulares, expressão gênica, atividade proteica, e rearranjos na morfologia celular são cruciais para o sucesso da infecção pelo patógeno (Garcia *et al.*, 2008; Goulart *et al.*, 2010).

A integridade do citoesqueleto de actina é fundamental na morfologia de fungos, sendo utilizado em diversos processos celulares como captação de nutrientes, motilidade, secreção de vesículas, replicação celular, entre outros (Moseley & Goode, 2006; Ballou *et al.*, 2010; Galletta *et al.*, 2010). Muitas proteínas acessórias do citoesqueleto de actina estão envolvidas na organização e morfologia celular de fungos, dentre elas a tropomiosina (Liu & Bretscher 1989, 1992; Drees *et al.*, 1995; Galletta *et al.*, 2010). Estudos anteriores demonstram uma participação importante da tropomiosina na morfologia e crescimento de leveduras, porém pouco se sabe sobre sua participação no processo de virulência do *Cryptococcus* (Liu & Bretscher, 1989, 1992; Drees *et al.*, 1995).

Para *C. gattii* não há estudos evidenciando a importância da tropomiosina para a levedura e sua virulência. Conhecer os mecanismos que regulam a morfologia durante o processo de infecção no hospedeiro é essencial para contribuir no desenvolvimento de novas terapias contra a criptococose. Neste contexto o presente trabalho visa contribuir para o entendimento da

participação da tropomiosina na virulência de *C. gattii*, utilizando a linhagem hipervirulenta R265, proveniente do surto de criptococose, nas ilhas de Vancouver – Canadá (Kidd *et al.*, 2004). Foi construída uma linhagem mutante para o gene da tropomiosina com subsequentes análises de morfologia e virulência da levedura, que podem contribuir para um melhor entendimento sobre o papel da tropomiosina na morfologia e virulência de *C. gattii*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Citoesqueleto

Todas as células são continuamente expostas a situações que requerem o remodelamento do seu citoesqueleto para se adaptar a diferentes situações e regular processos críticos como endocitose, citocinese, polaridade celular e morfogênese (Engqvist-Goldstein & Drubin, 2003; Moseley & Goode, 2006). Esses eventos ocorrem de maneira coordenada e são dirigidos por uma série de proteínas associadas à actina, e por numerosas moléculas sinalizadoras como miosina, tropomiosina, cofilina, o complexo Arp2/3, assim como fatores promotores de nucleação (NPFs) que recrutam e ativam proteínas essenciais à montagem do complexo de actina e suas proteínas associadas (Balasubramanian & Glotzer, 2004; Balcer *et al.*, 2003; Moseley & Goode, 2006). É necessário um controle rápido e preciso das estruturas ligadas à

actina para responder a estímulos internos e externos que necessitam alterações de citoesqueleto.

Ao passo que o citoesqueleto de actina vem apresentando muitos componentes de sua estrutura conservados entre diversos organismos, leveduras vêm se mostrando um ótimo modelo de estudo para o melhor entendimento da dinâmica do citoesqueleto e sua participação nos mais variados processos celulares, inclusive no estudo da patogênese de algumas espécies (Bi, 2001; Balasubramanian & Glotzer, 2004; Gourlay *et al.*, 2004; Moseley & Goode, 2006). Em leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, o citoesqueleto de actina consiste em pontos ou manchas corticais, “*patches*” e filamentos longos, “*cables*” (Amberg, 1998). Enquanto as estruturas “*patches*” e “*cables*” são visíveis em todos os momentos do ciclo celular, as estruturas de actina do anel citocinético (“*ring*”) são visualizadas somente antes e durante a citocinese (Figura 1) (Amberg, 1998). Kopecka e colaboradores demonstraram que *C. neoformans* possui um citoesqueleto de actina altamente desenvolvido e mantém uma dinâmica idêntica a encontrada em *S. cerevisiae*, consistindo em cabos, pontos e um anel citocinético (Kopecka *et al.*, 2001). *Cryptococcus laurentii* uma levedura basidiomicética com características similares a *C. neoformans*, porém de patogenicidade baixa, também apresenta um citoesqueleto de actina com estrutura e propriedades funcionais conservadas durante seu ciclo celular (David *et al.*, 2007).

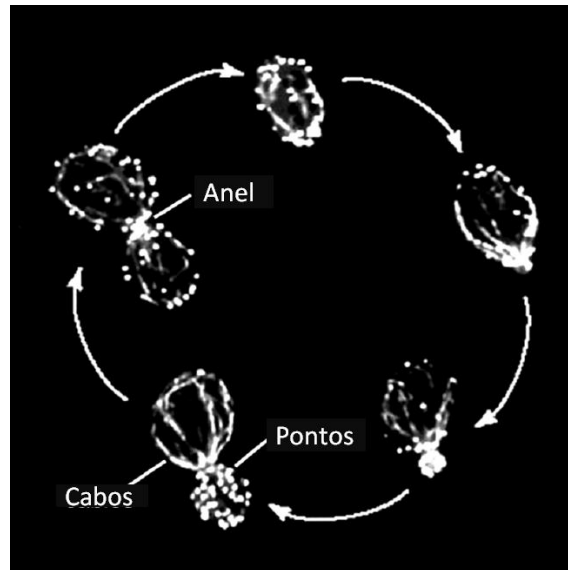


Figura 1. Ciclo celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* regulado pelo citoesqueleto de actina. Leveduras em diferentes estágios do ciclo celular contendo três diferentes estruturas: pontos corticais de actina, actina polarizada em filamentos, e um anel de actina citocinético. As células foram fixadas após cultivo e marcadas com rodamina-faloidina para visualizar as estruturas de actina. Adaptado de Amberg (1998).

Os pontos de actina observados em leveduras participam de ambos mecanismos de endocitose e exocitose, sendo observados agregados destes pontos nos locais onde estão ocorrendo estes processos na célula, o que define a importância de sua formação para auxiliar tais eventos, essenciais em leveduras (Riezman, 1985; Kubler & Riezman, 1993; Raths *et al.*, 1993; Mulholland *et al.*, 1997). Moseley e colaboradores desenvolveu um modelo para descrever o processo de endocitose e a participação de várias moléculas acessórias deste evento (Figura 2) (Moseley & Goode, 2006).

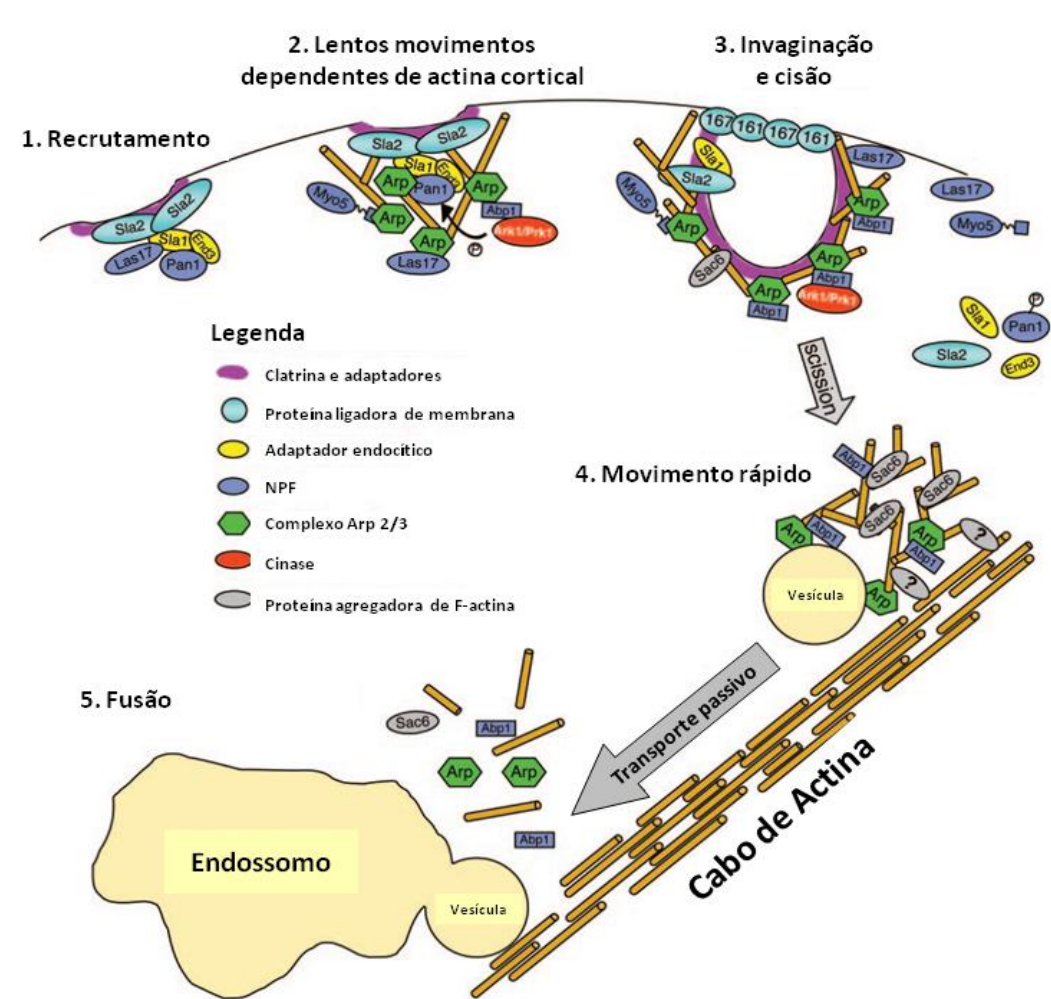


Figura 2. Modelo para desenvolvimento dos pontos de actina.

Recrutamento de fatores até o córtex celular promovem a montagem do complexo de actina associada à moléculas acessórias para formar a vesícula endocítica, e posteriormente direcioná-la até o endossoma da célula em um mecanismos de transporte dependente de actina. Adaptado de Moseley & Goode, 2006.

No modelo de endocitose proposto por Moseley *et al* (2006), observa-se a participação de inúmeras moléculas acessórias ligadoras de actina que promovem a montagem de um complexo permitindo que o processo ocorra. Primeiramente receptores recrutam componentes iniciais incluindo clatrina, adaptadores e NPFs, para o córtex celular formando um complexo imobilizado

neste ponto. Ocorre então a ativação do complexo Arp 2/3 que promove a nucleação da actina e movimento lento deste complexo para o córtex da célula, e, durante este estágio são recrutados outros NPFs (Abp1, Myo3/5) que promovem a fosforilação de algumas proteínas ligadas ao complexo e conseqüentemente a cisão e internalização da vesícula. Seguidamente o complexo Arp2/3, Abp1, Sac6, Cap1/Cap2, e outros componentes mantém associação com a vesícula internalizada e são direcionadas aos cabos de actina movendo-se passivamente associadas a estes cabos até a fusão com endossomos da célula concomitantemente com a desmontagem do complexo de actina (Moseley & Goode, 2006). Dentro deste contexto, torna-se necessária a participação importante de proteínas ligadoras de actina para que a endocitose, um importante evento celular, ocorra de forma coordenada e precisa.

Células leveduriformes utilizam o transporte ao longo dos cabos de actina para direcionar o crescimento polarizado e para segregar organelas antes da divisão celular (Bretscher, 2003, Pruyne *et al.*, 2004). Ainda na fase G1 do ciclo celular, células não brotadas detectam marcos remanescentes de uma prévia divisão celular, para selecionar um futuro sítio de brotamento, e fatores de polaridade são recrutados para este ponto da célula. A partir deste sítio, a montagem dos cabos de actina é iniciada, a qual leva a uma reorientação destes filamentos de actina direcionando o crescimento e secreção para o futuro broto (Pruyne *et al.*, 2004; Moseley & Goode 2006). Muitos estudos apontam a que mutações em diversos fatores podem influenciar a montagem e estabilidade dos cabos de actina levando a defeitos de polaridade celular. Estes fatores incluem tropomiosina, Sac6/fibrina, proteínas capeadoras, Srv2,

forminas, profilina e Bud6 (Adams et al, 1989; Amatruda et al, 1990; Haarer et al, 1990; Vojtek et al, 1991; Amberg et al, 1997; Evangelista et al, 1997; Evangelista et al, 2002). Uma vez que a polaridade celular é essencial para manter os processos de crescimento e divisão celular íntegros, proteínas acessórias envolvidas no processo de montagem a estabilidade dos filamentos de actina tornam-se fundamentais em leveduras, dentre elas a tropomiosina (Pruyne *et al.*, 1998).

2.2 Tropomiosina

Tropomiosina é uma proteína de citoesqueleto com funções amplamente reconhecidas desde fungos até outros eucariotos. A tropomiosina é constituída por unidades diméricas formando uma α -hélice em forma espiral enrolado (Phillips *et al.*, 1979). Quando associada à actina, as unidades diméricas interagem ponta a ponta ao longo dos seus filamentos para formar um filamento contínuo que envolve a superfície do filamento de actina (Holmes *et al.*, 1993; Cooper, 2002). Essa interação é responsável por estabilizar os filamentos de actina impedindo sua despolimerização da actina (Broschat *et al.*, 1989; Cooper, 2002).

Em leveduras, a cofilina, uma proteína responsável por desestabilizar os filamentos de actina é encontrada nos pontos corticais de actina, competindo com a tropomiosina pela ligação aos filamentos de F-actina (Bernstein & Bamburg, 1982; Cooper, 2002; Ono & Ono, 2002; Chen *et al.*, 2006). Assim, em células leveduriformes observa-se uma importante função de tropomiosina

onde, tropomiosina e cofilina apresentam efeitos opostos necessários para as rápidas adaptações celulares que requerem a funcionalidade do citoesqueleto (Moon *et al.*, 1993; Lappalainen & Drubin, 1997; Cooper, 2002). Portanto, a tropomiosina promove a proteção aos filamentos e impede a instabilidade nos processos celulares que requerem a formação dos cabos de actina. Além da formação dos cabos de actina, também foi demonstrada uma participação importante da tropomiosina na formação do anel citocinético entre o broto e a célula-mãe, processo essencial para reprodução de leveduras (Tolliday *et al.*, 2002). Dentro deste contexto observa-se uma função primordial da tropomiosina, onde ela regula a estabilidade dos filamentos de actina em diversos processos celulares envolvendo citoesqueleto, assim como regula a interação de proteínas ligadoras de actina como, por exemplo, a miosina, aos filamentos de actina (Tang & Ostap, 2001; Cooper, 2002).

Microrganismos patogênicos requerem uma morfologia íntegra para o sucesso do estabelecimento no hospedeiro, e subsequente patogenicidade. Inibidores de citoesqueleto são utilizados como eficientes fungicidas e agentes citostáticos (Kopecká *et al.*, 2001). Em leveduras as tropomiosinas apresentam-se localizadas nos cabos de actina e no anel citocinético, porém não apresentam-se associadas aos pontos de actina da célula (Moseley, 2006). Mutações em tropomiosina1 de *S. cerevisiae* demonstram a perda rápida dos cabos de actina, severos defeitos morfológicos e crescimento lento (Liu & Bretscher, 1989; Yamamoto *et al.* 2010). Observa-se, no entanto, uma importante função da tropomiosina na montagem dos cabos de actina, processo essencial para a polaridade celular e direcionamento de moléculas e complexos proteicos dentro da célula. A primeira evidência deste fato foi

demonstrada utilizando mutantes de *S. cerevisiae* para *tpm1* e *tpm2*, onde observou-se uma perda completa dos cabos de actina frente a estas mutações (Pruyne, 1998). Outras evidências apontam uma inibição da formação do complexo Arp2/3 por proteínas como Crn1 (ligadora de tropomiosina), fato que pode explicar porque este complexo não é encontrado nos cabos de actina que são decorados por tropomiosina (Blanchoin *et al*, 2001). Assim, o entendimento da participação da tropomiosina no citoesqueleto, sua arquitetura precisa e dinâmica para controlar eventos celulares importantes à patogenicidade, torna-se necessário para microrganismos como *Cryptococcus* sp.

2.3 O complexo *Cryptococcus*

C. neoformans e *C. gattii* são os agentes etiológicos da criptococose, doença fúngica de humanos e animais. Até recentemente, esses dois agentes etiológicos eram classificados como variedades da mesma espécie (Lin & Heitman, 2006). As duas espécies distinguem em características fenotípicas, bioquímicas, moleculares, genotípicas e epidemiológicas (Ma & May, 2009; D'Souza *et al.*, 2011). *C. neoformans* é encontrado no solo, vegetais em decomposição e fezes de aves, principalmente pombos (Casadeval & Perfect, 1998). Em contraste *C. gattii* é tipicamente encontrado em regiões de clima tropical e subtropical, sendo o seu principal nicho ecológico as árvores de eucalipto (Kwon-Chung & Bennett, 1984; Kidd *et al.*, 2004; Bartlett *et al.*, 2008; Dixit *et al.*, 2009; Galanis & Macdougall, 2010; Mak *et al.*, 2010). No entanto, um surto de criptococose causado por *C. gattii* ocorreu em Vancouver, no Canadá, onde o número de casos foi superior comparado a algumas regiões

endêmicas e vêm despertando o interesse de novas caracterizações da espécie (Kidd, 2004).

Além das diferenças acima citadas, as espécies foram genotipicamente classificadas sendo *C. gattii*, sorotipos capsulares B e C, classificado nos genótipos VGI, VGII, VGIII e VGIV, com o genótipo VGII subdividido em VGIIa, VGIIb, e VGIIc (Figura 3) (Bovers *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2009, Chaturvedi & Chaturvedi, 2011). O genótipo VGII é responsável pela maioria das infecções causadas pela espécie *C. gattii* no Canadá e Estados Unidos, sendo também encontrado em algumas regiões no Brasil (Kidd *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2011).

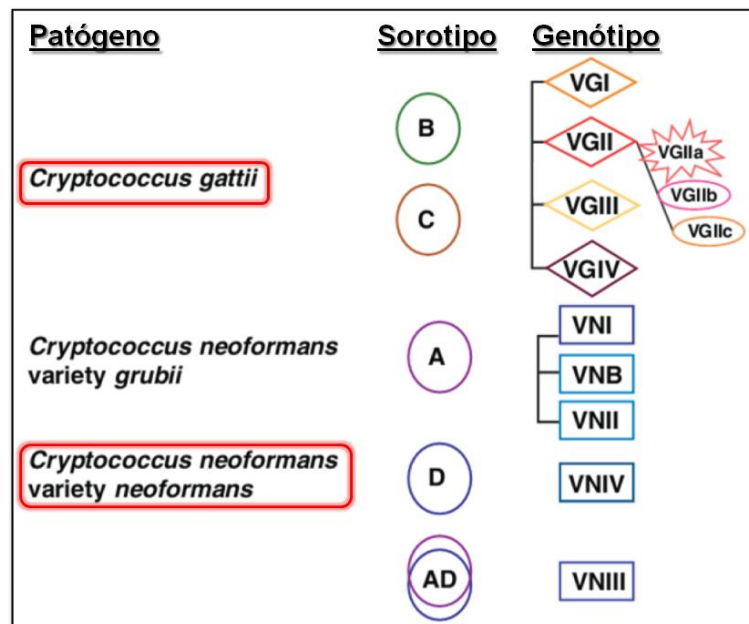


Figura 3. Sorotipos e genótipos de *C. gattii* e *C. neoformans*. *C. gattii* compreende os sorotipos B e C, e genótipos VGI, VGII, VGIII e VGIV. *C. neoformans* compreende os sorotipos A e D, e ainda AD, e genótipos VNI, VNB, VNII, VNIV e VNIII. Adaptado de Chaturvedi & Chaturvedi, 2011.

2.4 Criptococose

As espécies *C. neoformans* e *gattii* diferem principalmente no tipo de hospedeiro que acometem, uma vez que *C. neoformans* é responsável pelos quadros de criptococose em pacientes imunodeprimidos, enquanto *C. gattii* afeta preferencialmente hospedeiros imunocompetentes (Mitchell *et al.*, 1995; Speed & Dunt, 1995; Perfect & Casadevall 2002; Doering, 2009). A doença é geralmente adquirida através da inalação de basidiósporos ou de leveduras dessecadas presentes no ambiente (Casadevall & Perfect, 1998; Chaturvedi & Chaturvedi, 2011) (Figura 4). Tanto no meio ambiente quanto em seus hospedeiros, espécies patogênicas de *Cryptococcus* sp. se desenvolvem primariamente como leveduras unicelulares haploides. A doença atinge vários tecidos, incluindo pulmões, com subsequente disseminação através da circulação sanguínea, o que permite ao patógeno chegar ao cérebro, progredindo para a forma mais grave da doença, meningoencefalite (Perfect, 2002, Lin & Heitman 2006). Os quadros de meningite criptococócica e meningoencefalite podem deixar danos neuronais permanentes em pacientes acometidos pela criptococose. No entanto, devido à alta morbidade e mortalidade da doença, a terapia demonstra-se insatisfatória e não existe vacina contra o patógeno. A disseminação e sobrevivência do patógeno requer uma constante adaptação da levedura aos mais distintos ambientes encontrados no hospedeiro (Garcia *et al.*, 2008).

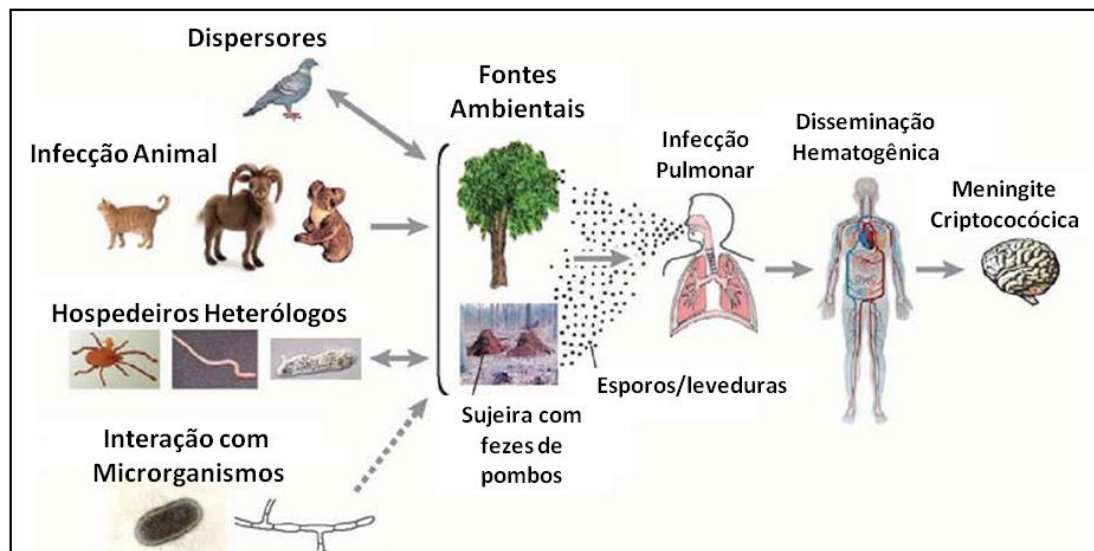


Figura 4. Ciclo de infecção de *Cryptococcus*. O fungo se dispersa através de seus hospedeiros ou carreadores. A levedura sobrevive em ambientes contaminados, solo (geralmente contaminados com excretas de pombos) e árvores. O fungo estabelece uma infecção pulmonar através da inalação de esporos ou leveduras dissecadas, com subsequente disseminação via hematogênica podendo ocasionar quadros de meningite ou meningoencefalite. Adaptado de Lin & Heitman, 2006.

2.5 Virulência

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são patógenos intracelulares facultativos, podendo sobreviver nos mais diversos tecidos do seu hospedeiro, ou mesmo dentro de células fagocíticas como, por exemplo, os macrófagos (Feldmesser *et al.*, 2001; Alvarez & Casadevall, 2006; Ma *et al.*, 2006). No entanto, essas adaptações constantes aos novos ambientes ocorrem através da modificação de diferentes compartimentos celulares, expressão de

genes, atividades de proteínas, arranjos lipídicos na membrana plasmática e produção de carboidratos (Casadevall *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2008).

Muitos fatores de virulência podem ser citados, como por exemplo, uma cápsula polissacarídica, produção de pigmentos, enzimas, assim como habilidade de crescimento a 37°C e dentro de macrófagos (Doering, 2009; Ma *et al.*, 2009; Perfect, 2005; Casadevall *et al.*, 2003; Cox *et al.*, 2000). O maior fator de virulência relacionado à patogenicidade do fungo é a produção de sua cápsula polissacarídica, onde os principais constituintes são os polissacarídeos glicuronoxilomanana (GXM), galactoxilomanana (GalXM) e manoproteínas (Janbon, 2004; McFadden *et al.*, 2006a). Glicuronoxilomanana é o principal componente capsular das espécies de *Cryptococcus* (Janbon, 2004; McFadden *et al.*, 2006a, 2006b), sendo sintetizado intracelularmente e secretado para o espaço extracelular em vesículas via exocitose (Garcia-Rivera *et al.*, 2004; Yoneda & Doering, 2006; Rodrigues *et al.*, 2007). As moléculas de GXM secretadas são, posteriormente, utilizadas para o crescimento capsular da levedura, o qual acontece por aumento na sua porção distal (McFadden *et al.*, 2006b; Zaragoza *et al.*, 2006; Frases *et al.*, 2009). Estudos recentes demonstraram que esse aumento do tamanho capsular acontece em um processo que envolve agregação do polissacarídeo mediado por cátions divalentes, uma vez que a agregação de moléculas de GXM é uma consequência da interação entre grupamentos carboxil de ácido glicurônico com cátions divalentes (Nimrichter *et al.*, 2007).

A habilidade da molécula de GXM ativar o sistema imune vem sendo observada por diversos autores (Monari *et al.*, 2005; Yauch *et al.*, 2005). Em *C.*

gattii a resposta inflamatória no pulmão é maior quando comparada com *C. neoformans* (Sweetser *et al.*, 1998). Uma maior atividade indutora da produção de óxido nítrico por macrófagos, associado com polissacarídeos de *C. gattii* sorotipo B, assim como diâmetros menores de GXM, sugere uma explicação para a observação consistente de respostas granulomatosas mais fortes em criptococose causada por esta espécie (Fonseca *et al.*, 2010).

Organismos eucariotos possuem diversos mecanismos de secreção. Rodrigues *et al* (2007) demonstrou que vesículas encontradas na parede celular de *C. neoformans*, assim como secretadas no meio extracelular, contém lipídeos como glicolisceramida e esterol, encontrados na membrana celular da levedura. Moléculas de GXM, além de ser encontradas na superfície de *Cryptococcus*, também se acumulam em tecidos do hospedeiro durante o processo infeccioso (McFadden *et al.*, 2006a). Rodrigues *et al.*, (2007) demonstraram que vesículas isoladas de *Cryptococcus* ligaram-se a um anticorpo anti-GXM, fato que confirma a secreção deste conteúdo por um mecanismo onde as vesículas atravessam a parede celular. Além disso, o tamanho capsular está relacionado com a presença de GXM no ambiente extracelular, sugerindo que o polissacarídeo presente nas vesículas é importante para a montagem da capsula polissacarídica da levedura (Rodrigues *et al.*, 2007). Estes dados demonstram que a secreção de vesículas constitui um fator importante na patogenia da levedura através do transporte de fatores de virulência para o ambiente extracelular. Outros componentes essenciais à virulência do patógeno como as enzimas lacase, fosfatase e urease também são encontradas em vesículas secretadas pela levedura, sendo que essas vesículas funcionam como “pacotes de virulência” capazes de

modular a interação patógeno-hospedeiro em favor do fungo (Eisenman *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2008). O estudo realizado por Eisenman *et al.*, (2009) determinou a importância de vesículas secretadas, denominadas melanossomas, em adquirir o substrato L-Dopa para produzir melanina de *C. neoformans*, um importante fator de virulência da levedura. Baseado nesses achados de secreção de vesículas contendo importantes fatores para *Cryptococcus*, um estudo utilizando ferramentas de proteômica identificou 76 diferentes proteínas em vesículas secretadas por *C. neoformans*, o que presume que podem existir muitos outros fatores secretados pelo fungo que poderiam atuar na modulação da resposta do hospedeiro ao patógeno (Rodrigues *et al.*, 2008).

O estudo de determinantes de virulência de *Cryptococcus* sp. constitui um fator essencial na busca de novos alvos terapêuticos e no entendimento das habilidades patogênicas da levedura. Com o auxílio de ferramentas genômicas para descoberta de novas moléculas envolvidas nos processos de interação patógeno-hospedeiro, torna-se possível a busca de alvos terapêuticos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a influencia da proteína tropomiosina na morfologia e nos fatores de virulência da levedura *Cryptococcus gattii*.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar uma busca no genoma de *Cryptococcus gattii* para identificar a sequência de nucleotídeos do gene que codifica para tropomiosina;
- Construir uma linhagem mutante estável para o gene da tropomiosina;
- Avaliar o perfil de crescimento a agentes estressantes;
- Realizar marcação para evidenciar localização de material genético nas células mutantes;
- Avaliar possíveis alterações de citoesqueleto da linhagem mutante;
- Analisar a formação de cápsula polissacarídica e a secreção de glucuronoxilomanana;

- Analisar a capacidade de sobrevivência à fagocitose e capacidade de virulência *in vivo*.

4. MANUSCRITO

**Disruption of Tropomyosin Gene Results in Attenuation of Virulence in
the Human Pathogen *Cryptococcus gattii***

Elisa Simon¹, Charley C. Staats^{1,2}, Livia Kmetzsch¹, Augusto Schrank^{1,2},
and Marilene H. Vainstein^{1,2*}.

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

² Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil;

*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

Cellular processes including cytokinesis, organelle transport and endocytosis require an intact cytoskeleton. Tropomyosin (Tpm1) is a cytoskeletal conserved dimeric coiled-coil protein, which forms polymers that associates along the length of each actin filament strand in muscle and non-muscle cells. Tpm1 is required to maintain the actin filament integrity and plays an important role in the secretion, localization, and function of many proteins, as well as in cell wall integrity and morphogenesis in fungi. In this study, a functional analysis of *Cryptococcus gattii* tropomyosin was conducted. Tpm1 is involved in the assembly of the polysaccharide capsule, morphology, and virulence of *C. gattii*. Disruption of *C. gattii* tropomyosin gene leads to changes in cytoskeleton, abnormal growth morphology and defective cell separation. Taken together, these results indicate a central role for Tpm1 in the assembly of the polysaccharide capsule, morphology and virulence of *C. gattii*.

1. Introduction

Tropomyosin is a cytoskeletal protein with functions widely recognized in fungi and other eukaryotes. Tropomyosin consists of two α -helical polypeptides which form a coiled coil in a parallel orientation (Payne & Rudnick, 1985; Phillips *et al.*, 1979). When combined with actin, the dimeric units interact end to end along their filaments to form a continuous filament surrounding the surface of the actin filament (Holmes *et al.*, 1993). Therefore, tropomyosin regulates the stability of actin filaments on cellular processes involving the cytoskeleton, and governs the interaction of actin-binding proteins, such as myosin (Tang & Ostap, 2001; Cooper, 2002).

In budding yeast, actin shows a cellular distribution that results in the direction of the cell material, present in two different places: filament extending from the mother cell to bud, and associated with cortical structures on the cell surface (Drees *et al.*, 1995). In *Saccharomyces cerevisiae*, the actin cytoskeleton is responsible for growth polarized events during budding and vesicle transport (Yamamoto *et al.*, 2010; Pruyne & Bretscher, 2000). According to Gunning *et al.* (2008) defects in polarized vesicle transport depolarize growth, leaving cells to swell into spherical shapes with no subsequent cell replication.

The incidence of infection with the human pathogenic fungus *Cryptococcus gattii* has increased considerably in recent years (Sellers *et al.*, 2012; Chaturvedi & Chaturvedi 2011; Kidd *et al.*, 2007). Synthesis of pigments, enzymes, polysaccharides and lipids, and ability to proliferate at human body temperature are well characterized pathogenic virulence determinants of *C. neoformans* and *C. gattii* (Doering, 2009; Ma *et al.*, 2009; Perfect & Casadevall,

2005; Casadevall *et al.*, 2003; Cox *et al.*, 2000). The capsule is the major determinant of virulence in *C. neoformans* and *C. gattii* (Chang & Kwon-Chung, 1994; Doering, 2009). The capsular polysaccharide is released to the extracellular space by secretor vesicles (Araujo *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2007, 2008; Bose *et al.*, 2003). Glucuronoxylomannan (GXM) is the major capsular polysaccharide comprising 90% capsule's mass of *Cryptococcus* sp. (Doering, 2009; Ninrichter *et al.*, 2007). Studies report that the *C. neoformans* polysaccharide capsule enlarges by distal growth, since the old capsular material remains close to the cell wall during capsular enlargement and the capsule is rearranged during budding (Zaragoza *et al.*, 2006; Ninrichter *et al.*, 2007).

Since the cellular cytoskeleton is involved in a variety of cellular processes including uptake of nutrients, signaling, motility, cytokinesis, and intercellular transport of organelles and vesicles (Galletta *et al.*, 2010; Skoumpla *et al.*, 2007; Liu & Bretscher, 1992; Pollack *et al.*, 1975), pathogenic microorganisms require an integrated morphology for the successful establishment of infection in the host. Here we report the functional characterization of *C. gattii* tropomyosin. Our findings indicate that this protein is essential for virulence of *C. gattii* in a mouse model of infection.

2. Experimental procedures

2.1 Fungal strains, plasmids and media

Cryptococcus gattii serotype B (R265 strain) was used for transformation. The actin lateral binding protein, tropomyosin (Tpm1) gene was identified in *C.*

gattii genomic database (Broad Institute Accession number CNBG_1839.2). The strains were maintained on YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose and 1.5% agar). YPD plates containing hygromycin (200µg/ml) were used to select *C. gattii tpm1* deletion transformants (*tpm1*Δ strain). YPD plates containing nourseothricin (100µg/ml) were used to select *C. gattii tpm1*Δ reconstituted transformants (*tpm1*Δ::TPM1 strain). Plasmid pAI4, which contains the nourseothricin marker cassette, was kindly provided by Alexander Idnurm (University of Missouri-Kansas City Kansas City, MO USA). Plasmids were maintained in *Escherichia coli* grown at 37°C in LB broth or on agar supplemented with 50 µg/ml of kanamycin.

2.2 Disruption and complementation of *C. gattii* TPM1

For disruption of *Tpm1* gene, the Delsgate methodology (Garcia-Pedrajas *et al.*, 2008; Kmetzsch *et al.*, 2010) was employed. The 5' and 3' *Tpm1* flanks (1Kb each) were PCR amplified, and gel purified using Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare). One hundred and fifth ng of pDONRHYG (Kmetzsch *et al.* 2010) vector and 30 ng of each 5' and 3' flanks were utilized in the BP clonase reaction (Invitrogen). This reaction was transformed into *Escherichia coli* One Shot OmniMax (Invitrogen). After confirmation of the correct deletion construct, the plasmid was linearized by I-SceI digestion, and then submitted to *C. gattii* biolistic transformation according Toffaletti *et al* (1993). Transformants were screened by PCR, and the deletion was confirmed by Southern blot analysis. The plasmid pAI4 was used for construction of complementation strain. A 2.4 Kb genomic PCR fragment containing the wild-type TPM1 gene was cloned into the *Sma*I site of the pAI4 plasmid. This construct was transformed in the *C. gattii tpm1*Δ mutant strain by

biolistic transformation (Toffaletti *et al.*, 1993). The insertion gene of complemented strain was confirmed by Southern blot analysis.

2.3 Growth assays

Spot plate assays were performed to evaluate the sensibility of strains to temperature and depleting reagents. The WT and mutant strains were grown overnight in YPD medium and cell suspensions at $OD_{600} = 1$ were washed with sterile PBS. Serial dilutions were made and 2.5 μ l of the suspensions were spotted onto the plates for further incubation at 30 and 37°C for 48 hours. YPD plates were supplemented with $ZnCl_2$ (2 mM) or NaCl (1.5 M).

2.4 Capsule size measurement

To measure capsule size of strains, the yeast cells were analyzed by Indian ink staining after incubation for 8, 16, 24 and 48 hours at 37°C and 5% CO_2 , in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). To determine capsule measurements one hundred cells of each strain were analyzed. The diameter of the whole cell (capsule included) and cell body was measured with ImageJ software. Capsule size was calculated as the ratio of capsule size/cell diameter.

2.5 Determination of GXM concentration in fungal supernatants

According Fonseca *et al.*, (2010) we obtained the culture supernatants. We determined GXM concentration in fungal supernatants by ELISA with mAb 18B7, using modifications of a previously described protocol for GXM detection (Casadevall *et al.*, 1992; Fonseca *et al.*, 2009). Sequentially, 96-well polystyrene plates were coated with standard GXM, supernatant samples for further blocking with bovine serum albumin. The plates were then incubated

with mAb 18B7 and an alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG1 for 1 h. The reactions were developed with addition of p-nitrophenyl phosphate disodium hexahydrate, and then by measuring absorbance at 405 nm with a micro-plate reader (TP-reader, Thermo Plate). Antibody concentration in this assay corresponded to 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

2.6 Fluorescence microscopy

According to procedures described by Fonseca *et al* (2009), the lectin wheat germ agglutinin (WGA) was used to evaluate the presence of chitin-like structures by fluorescence microscopy. Yeasts cells were cultured in 50 ml of YPD medium at 30°C overnight with shaking, and 10^6 were suspended in 4% paraformaldehyde and incubated for 30 min at room temperature. After fixed, the cells were washed twice in PBS and blocked for 1h in 1% bovine serum albumin in PBS (PBS-BSA). The cells were then suspended in 100 μl of a 5 $\mu\text{g/ml}$ solution of FITC conjugate of WGA (Molecular Probes) and incubated for 30 min at 37°C in the dark. To detect the cell wall, cells were incubated with 50 $\mu\text{g/ml}$ solution of calcofluor white (Invitrogen, Carlsbad, CA) under the same conditions. To access F-actin cells were collected with centrifugation and washed three times with PBS for five minutes. Cells were then suspended in 25 μL (5U) of rhodamine-phalloidin to identify F-actin. After, the cells were washed in PBS, suspended in 50 μl of 50% glycerol in PBS and were placed onto glass slides. Images were analyzed and collected using an Olympus FluoView 1000 Confocal Laser Scanning Microscope.

To stain the nuclei, after washing, the cells were incubated for 1 hour with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) at a final concentration of $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

The cytoskeleton microtubules was visualized with the yeast cells cultured in 50 ml of YPD medium at 30°C overnight with shaking, and 10^6 were wash twice in PBS and suspended in 4% paraformaldehyde in a buffer containing 0.1M KH_2PO_4 , 1.25 mM MgCl_2 , supplemented with 1.25 mM Ethylene Glycol-bis(β -aminoethyl-ether)-N',N',N',N'-Tetra Acid (EGTA) at pH 6.9 for 90 min. Then, after three washes with PBS the cells were exposed to lysing enzymes isolated from *Trichoderma harzianum* (Sigma), at a final concentration of $1 \text{mg}.\text{ml}^{-1}$ in PBS for 20 min. After centrifugation, yeast cells were permeabilized in 1 ml of 0.3 % Triton X-100 in PBS for 15 min, subsequently washed with PBS and incubated with 2.0% bovine serum albumin (BSA) for 30 min at 37°C. The cells were washed with PBS and incubated with monoclonal anti- β -tubulin antibody produced in mouse (1:100) for 60 min at 37°C. After three washes with PBS, anti-mouse IgG produced in rabbit was added at a dilution 1:200, 60 min at 37°C. Subsequently, the cells were washed twice with 1% BSA in PBS (Gabriel *et al.* 1998). The cells were analyzed by fluorescence microscopy as previously described.

2.7 Macrophage interaction assays

A total of 10^5 cells of RAW 264.7 macrophages were plated into each well of a 96 well dish and incubated in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (37°C, 5% CO_2) for 16 h. *C. gattii* WT and *tpm1* Δ mutant cells previously grown in minimal medium (15 mM glucose, 10 mM MgSO_4 , 29.4 mM KH_2PO_4 , 13 mM

glycine, and 3 μ M thiamine.HCl) were washed twice in sterile PBS. After washing, the fungal cells were diluted in DMEM and added to each macrophage containing well at a total of 10^7 yeasts cells. After 16 h of incubation, free yeast cells present in the supernatant were removed by extensive washing with PBS, and infected macrophages were lysed with cold water. After, the resulting suspension was plated onto solid YPD for colony forming unit (CFU) determination.

2.8 Virulence assay

According to a previously described intranasal inhalation infection model (Cox *et al.*, 2000; Kmetzsch *et al.*, 2010), the virulence studies were performed using eight female BALB/c mice (approximately 5 weeks old) for each strain. Fungal cells were cultured in 50 ml of YPD medium at 30°C overnight with shaking, washed twice and inoculated in saline. Groups of eight female mice were infected with 10^7 yeast cells suspended in 50 μ l of saline and monitored daily. The animal studies were approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Ethics Committee. For analysis of survival we performed Kaplan-Meier test using GraphPad Software.

3. Results

The search in genomic database revealed a 724bp *tpm1* coding sequence with four introns (Broad Institute, Accession number CNBG_1839.2), and translates a predicted sequence protein containing 169 aminoacids, comprising the sequence: MDKIKERFAILGQKIEAAEARAEAAESENKKLNQTLLEERDQELA

SVQHKLQLAEEEELEASESKVKELKAASDEGETHRTTGENLARKVQLLEEELDK
AEKDLKETTEKLRQVDVKAEHFERQVQRLEQERDEWERKHGEAVEKYQQSK
RELDEVVMQMESLVSYTCVP.

3.1 TPM1 disruption results in abnormal budding morphology, defective cell separation and defects in nuclear localization

Koziol *et al* (2005) demonstrates that hypertonic medium (containing 0.8 M NaCl) increases the generation of superoxide and other reactive species in yeast cells and antioxidants protect the yeast *S. cerevisiae* against hypertonic stress. Other study that an exclusion of toxic zinc (Zn) from the cytoplasm mediated by the GDI1 protein related vesicle transport system ameliorates Zn toxicity in *S. cerevisiae*, demonstrating that exclusion cellular systems are required for toxic metals to the integrity of the yeast (Ezaki, 2012). To evaluate if *tpm1* gene mutation affected *C. gattii* growth, spot plate assays were conducted to determine sensitivity to 30°C and 37°C temperature growth and to stressors NaCl and ZnCl₂. For both temperatures and both agents mutants displayed increased sensitivity as show in Figure 1A. An evaluation of the cell morphology at 30°C demonstrated that *tpm1Δ* has a morphological defect (Figure 1B). Previous studies showed a similar state of elongation for *rom2* mutants in *S. cerevisiae* and *C. neoformans*, which encodes for GDP/GTP exchange factor (GEF) for Rho1p and Rho2p (Manning *et al.*, 1997; Fuchs *et al.*, 2007). For many times the hyperelongated structures were longer and several times wider than the diameter of normal, unbudded cells. The cells within the chain varied in size and a lack of cytokinesis was observed between newly budded cells (Figure 1B). Once the cells had defects in cell division, we investigated changes in nuclear location in *C. gattii* cells using 4',6-diamidino-2-phenylindole

dihydrochloride (DAPI) staining. Interestingly, mutant cells showed defects in the location of nuclei. These cells contain multiple cellular complexes in a chain and many of the complexes were absent of a nucleus, while others showed accumulation of nuclear material (Figure 2).

3.2 Lack of Tropomyosin alters the actin organization

According to Kopecká *et al.* (2001) *C. neoformans* cells present an organization and dynamics of actin cytoskeleton very similar to *S. cerevisiae*, and the normal distribution of F-actin cytoskeleton in *Cryptococcus* is comprised of cortical patches, cables and cytokinetic rings. We hypothesized that a potential cause of morphological changes of the *tpm1* mutant are alterations in actin polymerization and organization. We assessed actin localization of *C. gattii tpm1Δ* using rhodamine-phalloidin that stains for F-actin. Staining with rhodamine-phalloidin showed actin concentrated in cortical patches evenly distributed throughout the WT cells (Figure 3). However, in the hyperelongated cells of *tpm1Δ*, actin was found in high density on the periphery of the cell rather than distributed throughout the cell (Figure 3D).

3.3 Abnormal chitin deposition occurs in TPM1 mutants

We examined the distribution of chitin and chito oligomers by staining cells with CFW and WGA. The distribution of chitin was observed by calcofluor staining near the cell wall and along the cortex in the wild type and *tpm1Δ* strains (Figure 3E and F) demonstrating a regular chitin expression. When staining by WGA, WT cells show the typical profile of staining of β -1,4-linked GlcNAc oligomers (Figure 3E). In contrast, mutant cells showed chito oligomers deposition only in certain compartments of the hyperelongated cells (Figure 3F).

3.4 Disruption of the TPM1 gene does not block GXM secretion, but impairs the capsule formation

Since GXM is essential in the formation and architecture of the capsule, we analyzed the ability of *tpm1* mutant to form a polysaccharide capsule and secrete GXM. India ink staining is the simplest method for evaluating capsule expression in *Cryptococcus* species. In capsule-inducing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), the *tpm1* mutant cells showed a reduced ability to form a polysaccharide capsule at 8, 16 and 24 hours at 37°C, 5% atmosphere CO₂, in comparison to the wild-type and complemented strains (Figure 4A-D). In contrast, extracellular levels of the capsular polysaccharide GXM was significantly higher for tropomyosin mutant cells (Figure 4E). These data demonstrated that the secretion of GXM, the most abundant capsular polysaccharide, was not affected in the mutant cells, but there was a difficulty in adding this content to the cell to form the polysaccharide capsule.

3.5 Tropomyosin is essential for interaction of *C. gattii* with murine macrophages

Since tropomyosin regulates the morphology of the fungus, and the formation of capsular polysaccharide, we assess some virulence factors of the fungus. No differences were found in the production of melanin pigment and the enzyme urease (data not shown). Then, we have investigated the rate of phagocytosis by macrophages in tropomyosin null mutant compared to WT. Our data revealed that the survival indices of *C. gattii* mutants after interaction with the phagocytes was reduced compared to cells from WT strain (Figure 5A).

3.6 TPM1 mutant had attenuated virulence in an animal model of cryptococcosis

To test the hypothesis that tropomyosin is involved in virulence of *C. gattii*, the studies were performed using an intranasal inhalation infection model in mice. The results showed that mice infected with the wild type or the complemented mutant exhibited median survival of 11 and 9 days, respectively. We observed that, in contrast with the WT and complemented strain, the *tpm1* Δ strain was avirulent 30 days post-infection (Figure. 5B). This result suggests that *tpm1* is required for the virulence of *C. gattii* in an animal model of cryptococcosis, but we suggest confirmation of the data.

4. Discussion

Cells need to quickly change their cytoskeleton in response to various internal and external stimuli. So, to survive in the host environment, microorganisms often direct quite dramatic morphogenetic processes to maintain or alter their cell size, shape or volume (Ballou *et al.*, 2010). In fungi, processes as endocytosis, cytokinesis, cell polarity, and cell morphogenesis, require a constant remodeling of the cytoskeleton (Shen *et al.*, 2011). A number of factors are responsible for coordinating these events, such as highly conserved actin binding proteins, and cellular signaling events (Moseley & Goode, 2006). In this study, we report the importance of an actin-binding protein of *C. gattii* in the assembly of the polysaccharide capsule, morphology and virulence of the yeast.

Since tropomyosin is localized with actin cables, it is predictable that the absence of this protein results in changes in cytoskeleton, once this protein is essential for maintenance of cell morphology (Liu & Bretscher, 1989). It is known that in the yeast *S. cerevisiae*, mutations in the tropomyosin gene causes altered growth rate, changes the cell phenotype, and also impairs cell mating (Liu & Bretscher, 1992). Our results showed that disruption of tropomyosin gene in *C. gattii* led to a cell size heterogeneity without subsequent cell division (Fig 1B). Tropomyosin mutants show serious defects in the cellular morphology. Since the bud is not separated from the mother cell, a defect in cytokinesis was observed, resulting in cells jointed and clustered. In addition, *tpm1* Δ cells were large and more elongated when compared with WT cells.

Cryptococcus sp. is normally found in the unicellular yeast form in culture and in animal tissues. We demonstrated here that *C. gattii* with a disrupted *tpm1* gene was viable, but showed heterogeneity in cell size, and an affected cell division. Mutant cells have a failure of cell division; therefore, there is no separation between the mother cell and the bud. Tropomyosin is required for normal morphology, since mutant exhibits various degrees of abnormalities in morphology. Similar defects have been shown to cause abnormal morphology in *C. neoformans ras*, and *rom2* mutants (Fuchs *et al.*, 2007; Waugh *et al.*, 2002).

The actin cytoskeleton plays a vital role in the response to osmotic stress. Some stressors induce a transient and reversible disassembly of the actin cytoskeleton and many actin mutants exhibit osmosensitivity (Chowdhury *et al.*, 1992; Wertpman *et al.*, 1992). Here, tropomyosin null mutant exhibited more sensitivity to stressors compared to WT as showed in Fig 1A. To study the

distribution of nuclear morphology in cells with elongated phenotype, we employed 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) staining. The results indicated a role for tropomyosin in nuclear division or proper localization of nuclei in the budded cells, since the mutant cells showed an accumulation of nuclear material in certain cellular compartments and absence in others (Figure 2). We suggest that this accumulation may be due to inability in the division of the nucleic material or defects in the direction and location of this content.

In the basidiomycetous yeast *C. neoformans*, during its asexual reproduction by budding, staining with rhodamine-conjugated phalloidin revealed an F-actin cytoskeleton consisting of cortical patches, cables and cytokinetic ring, located in buds and mother cells in all other stages of development (Kopecka *et al.*, 2001). Previous studies showed that disruption of the yeast tropomyosin gene *tpm1* results in the apparent loss of actin cables from the cytoskeleton (Liu & Bretscher, 1989). Staining with rhodamine-phalloidin (F-actin) showed that actin is distributed throughout the wild type cell, while in the mutant cells actin localization was found at the cell periphery of $\Delta tpm1$ hyperelongated cells (Figure 3C-D). These data are consistent with the morphological defects, since the actin is essential in processes involving cell morphology.

During cell division in yeasts, a ring of chitin occurs at the neck of a budding cell and remains on the mother as a bud scar (Lesage & Bussey 2006). In *C. neoformans*, synthesis of chitin is directly linked with cell wall assembly and fungal growth (Baker *et al.*, 2007; Banks *et al.*, 2005). A role for chitin and chitooligomers in the capsular architecture of *C. neoformans* was recently demonstrated Fonseca *et al.* (2009). Studies have been demonstrated that

chitosan, the de-O-acetylated form of chitin, is required for cell wall integrity and consequently for maintenance of the correct assembly of the pigment melanin and the cryptococcal capsule (Baker *et al.*, 2007). Tropomyosin1 mutant cells showed abnormal deposition of chitin, but this phenotype is more severe in the larger cells. In these cells, we also observed that the contents of chitooligomers appeared as mass dense irregularly distributed in some points of the cells, while some compartments were not stained by WGA (Figure 3F). These data demonstrate a role of tropomyosin in the actin organization and regular distribution of the content of cell wall.

The polysaccharide capsule is defined as a major virulence factor, and studies of capsule synthesis have been widely performed (Doering, 2009; Chang & Kwon-Chung 1994; Fromtling *et al.*, 1982). Glucuronoxylomannan is synthesized intracellular and secreted via exocytosis (Yoneda & Doering 2006). Rodrigues *et al* (2008) demonstrated that extracellular vesicles secreted from *Cryptococcus* were associated with anti-GXM Ab-reactive material and membrane lipids.

The production of capsular polysaccharide GXM, as well their secretion into the extracellular environment are crucial for virulence of *Cryptococcus*, since strains defective in its production or secretion have an avirulent phenotype (Zaragoza *et al.*, 2009). The presence of polysaccharide in the tissues and secretions of the host may generate a number of deleterious effects during infection (Vecchiarelli, 2000).

In fungi the secretion of proteins, pigments and lipids into the extracellular environment involves many mechanisms (Robinson *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*,

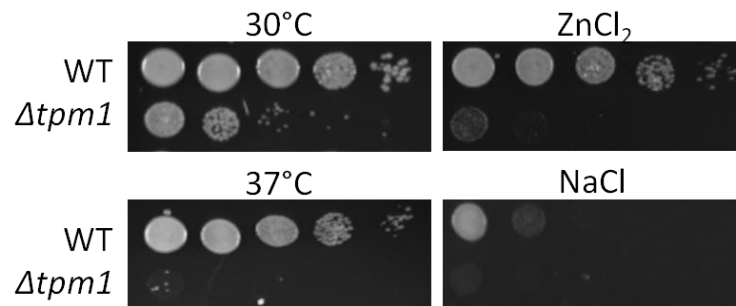
2010a, 2010b). The fungal cell wall plays an important role in many biological processes such as form, morphogenesis and reproduction (Ninrichter *et al.*, 2005). Since vesicles containing virulence factors such as lipids and polysaccharides can reach the extracellular environment through the fungal cell wall (Robinson *et al.*, 2007), it is essential to the integrity of this cellular component for controlling the discharge events. In this context, it is important to evaluate if the defects caused in cells *tpm1* Δ can affect the secretion of GXM and the formation of capsular polysaccharide. There was a considerable decrease in the size of the capsule of the yeast mutant tropomyosin at 8 hours of culture (Figure 4). To investigate whether the reduction in capsule is a consequence of reduced production of the polysaccharide or its secretion, we evaluated the contents of GXM secreted mutant cells. Interestingly, the levels of GXM polysaccharide secreted into the culture supernatant were higher when compared to WT. Since the capsular polysaccharides are produced intracellular and secreted to the extracellular milieu and then added to the cell to capsule formation, it is suggested that tropomyosin plays a role in the cell aggregation polysaccharide and not in their production (Figure 5).

C. gattii R265 show higher levels of intracellular replication in macrophages compared to other strains of *C. gattii* (Ma & May, 2009). According to Luberto *et al.* (2003), within phagocytic cells *Cryptococcus* spp. can migrate from primary focus of infection to other sites that allow it to spread and escape from the immune system of their host. This mechanism is known as "Trojan horse". Since phagocytosis is an important determinant in the pathogenesis of *Cryptococcus*, the survival rate of wild type and mutant strains were evaluated. The mutant cells were more effectively phagocytized and killed by

macrophages, and the mutants cells also were not efficient in killing lethally infected mice at least 30 days post infection. Our findings indicate that *C. gattii* tropomyosin gene disruption affect cell morphology, assembly of the capsule and virulence of the yeast. So, we demonstrated here a potential role for tropomyosin in polysaccharide capsule assembly and cryptococcal virulence.

Figures

A



B

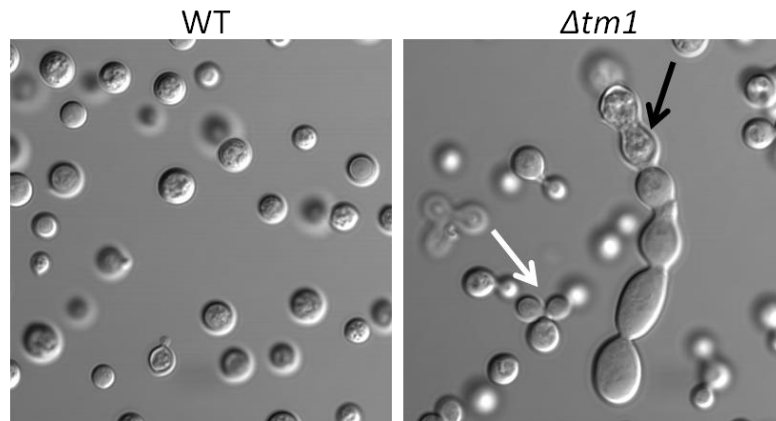


Figure 1. Serial dilutions and micrographs of *C. gattii* morphology after 48 hours of growth are presented for WT and *tpm1* Δ . A. The sensitivity of WT and *tpm1* mutant cells in YPD at 30°C or 37°C supplemented with ZnCl₂ (2 mM) or NaCl (1,5 M). B. The WT cells appear to have a round morphology. C. In the *tpm1* Δ strain, the hyperelongated morphology is observed. White arrows indicate cells that form a cluster. The black arrow indicated a hyperelongated complex. 100 X magnifications.

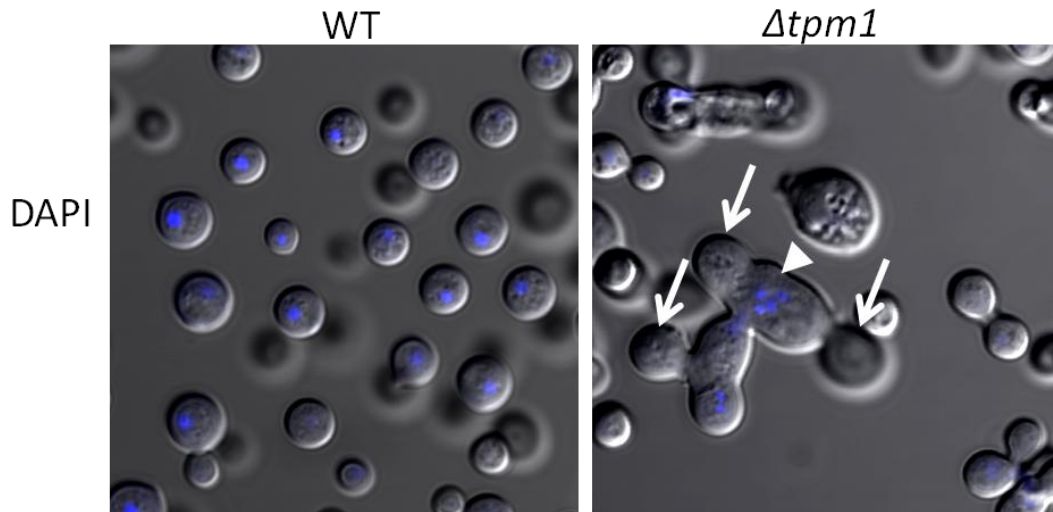


Figure 2. Nuclear defects in hyperelongated *tpm1* null mutant cells. DAPI staining of the WT and *tpm1* Δ hyperelongated cell complex. The arrowhead indicates a cellular compartment with multiple nuclei. Arrows indicate the cell complexes that lack a nucleus.

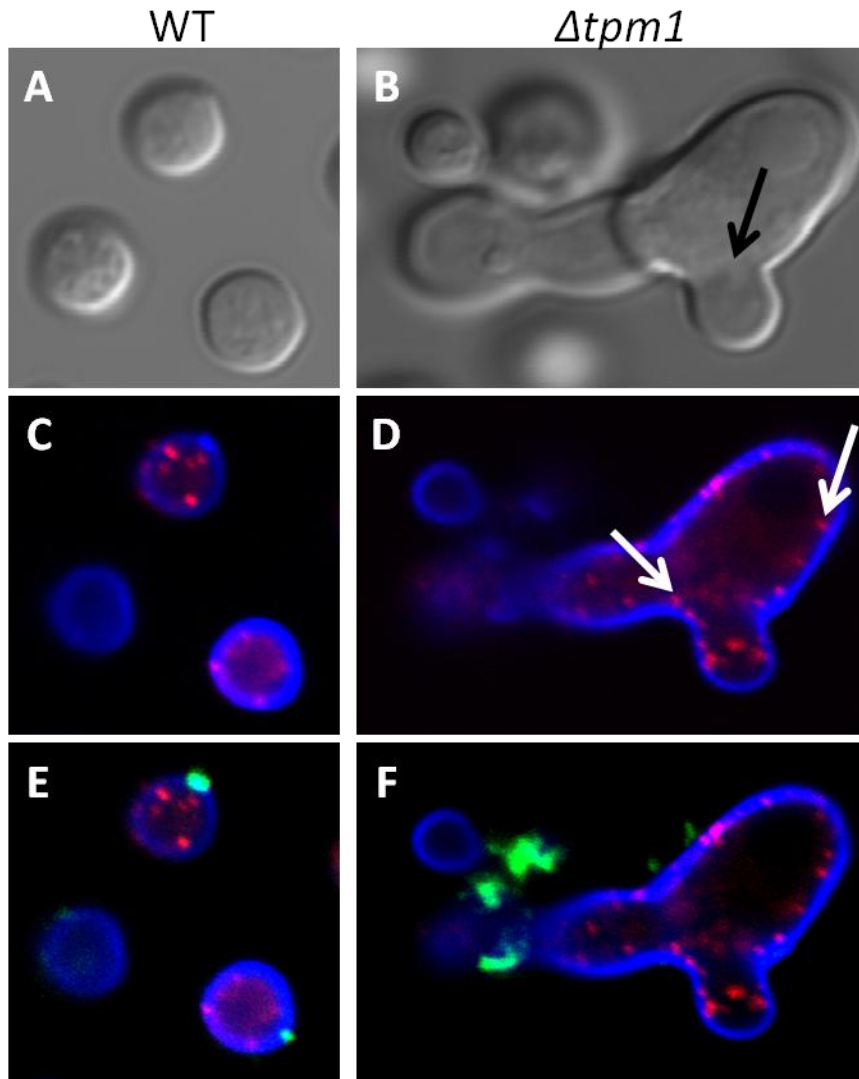


Figure 3. *C. gattii* cell wall and actin organization. Cells of WT and *tpm1* Δ strain were treated with calcofluor white (blue staining), rhodamine-phalloidin (red staining), and WGA (green staining) and analyzed by fluorescence microscopy. A and B. DIC image, the black arrow indicates the region of the cell that is defective for cytokinesis indicated by a lack of cell wall formation between the cell complexes. C and D. Staining with rhodamine-phalloidin shows that actin is distributed throughout the wild type cell, white arrows indicate actin localization at the cell periphery of *tpm1* Δ hyperelongated cells. E and F. Calcofluor white and WGA staining showing chitin and chitooligomers deposition in WT and *tpm1* Δ hyperelongated cells.

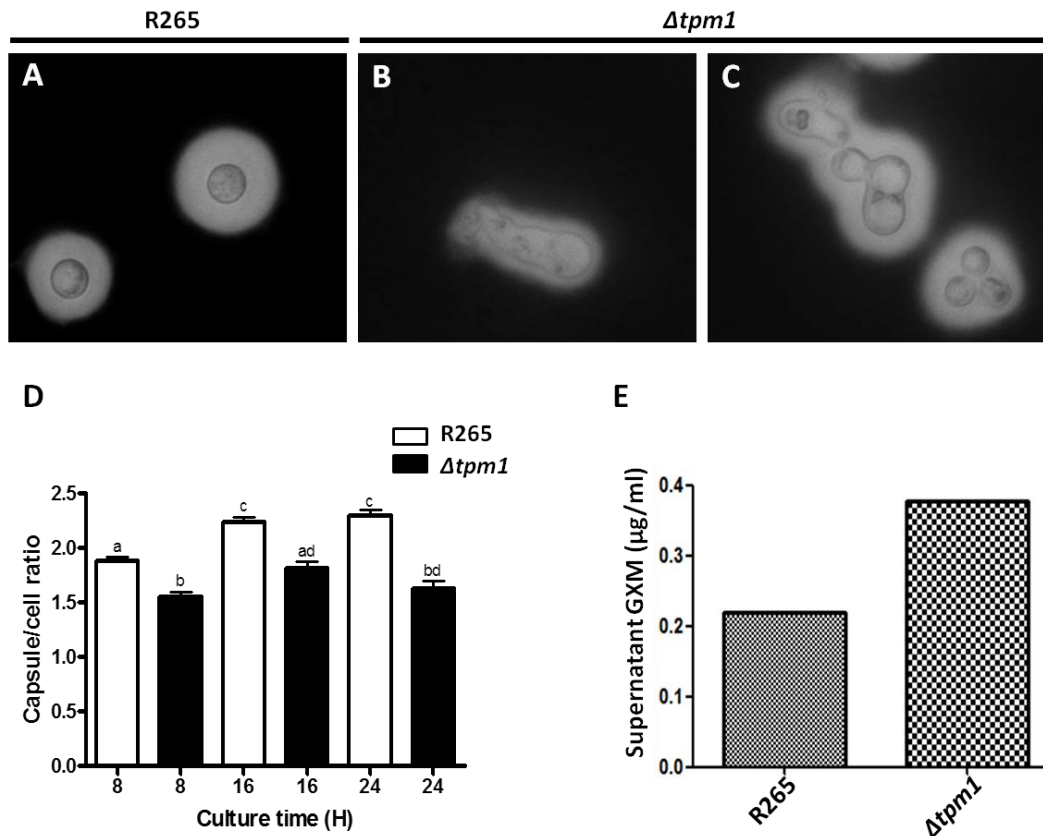


Figure 4. TPM1 is required for normal GXM secretion and capsule assembly. A, B and C. India ink counterstaining of *C. gattii* cells. D. Determination of capsule size of the *C. gattii* cells strains E. GXM determination in culture supernatants indicating that *C. gattii* $tpm1\Delta$ mutant shows an increased content of extracellular GXM. Statistical analysis of the results shown in D and E indicates that values obtained for the $tpm1$ mutant are significantly smaller than those found for WT ($P < 0.05$ in all cases). Were performed two independent experiments in triplicate in all cases.

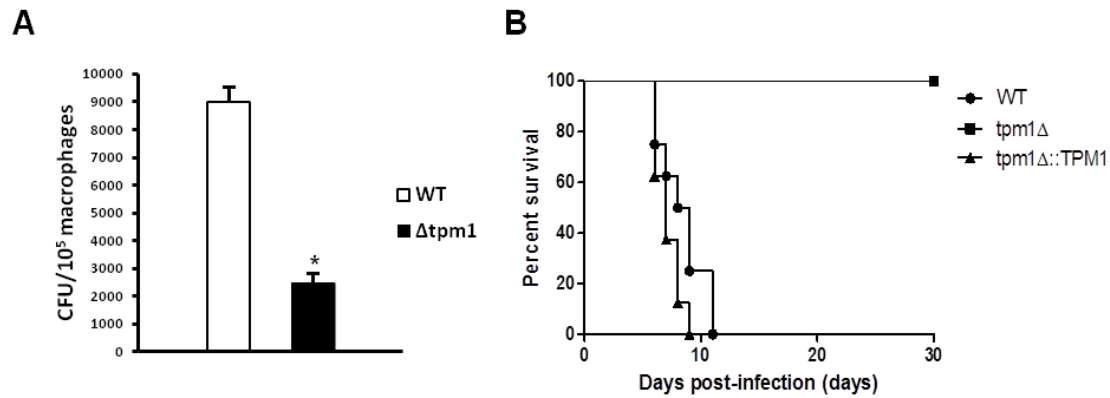


Figure 5. Virulence of *C. gattii* was affected by TPM1 deletion. (A) Survival after interaction with macrophages. The *tpm1*Δ strain was significantly more susceptible to killing by macrophages than WT (*) cells ($P < 0.01$). (B) Virulence assay of WT, mutant (*tpm1*Δ) and complemented (*tpm1*Δ::TPM1) strains of *C. gattii* R265. The *tpm1* mutant was significantly more susceptible to killing by macrophages than WT (*) cells ($P < 0.01$). Animals infected with the mutant strain survived significantly longer than WT (*) and complemented (**) cells ($P < 0.01$). Were performed two independent experiments in triplicate in A and B.

TABLE 1. List of oligonucleotide used in this study.

Primer name	Sequence (5'-3')	Purpose
DeltaTpm1-1F	AAAATAGGGATAACAGGGTAATATGTTGTTCCCTTTGCCTGCT	Disruption construct for TPM1, 5' flank
DeltaTpm1-4R	AAAAATTACCCTGTTATCCCTATTTCAAGGGCGGCAGTGACC	Disruption construct for TPM1, 5' flank
DeltaTpm1-2F	GGGACAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGGATTTAAATGCTCACATT	Disruption construct for TPM1, 3' flank
DeltaTpm1-3R	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTATCTAACTGACATTGTCA	Disruption construct for TPM1, 3' flank
CoCGTM1F	ATGTTGTTCCCTTTGCCTGCT	Amplification of TPM1 for complementation
CoCGTM1R	GCGAGAGGGTTATGTAGTCTCATT	Amplification of TPM1 for complementation

References

1. Araujo Gde S., Fonseca F.L., Pontes B., Torres A., Cordero R.J., Zancopé-Oliveira R.M., Casadevall A., Viana N.B., Nimrichter L., Rodrigues M.L., Garcia E.S., Souza W. and Frases S. (2012) Capsules from pathogenic and non-pathogenic *Cryptococcus* spp. manifest significant differences in structure and ability to protect against phagocytic cells. *PLoS One* 1: 29561.
2. Baker, L.G., Specht C.A., Donlin M.J., and Lodge J.K. (2007) Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 6: 855–867.
3. Ballou, E. R., C. B. Nichols, K. J. Miglia, L. Kozubowski, and J. A. Alspaugh. (2010) Two CDC42 paralogues modulate *Cryptococcus neoformans* thermotolerance and morphogenesis under host physiological conditions. *Mol Microbiol* 75: 763-780.
4. Banks, I.R., C.A. Specht, M.J. Donlin, K.J. Gerik, S.M. Levitz, and J.K. Lodge (2005) A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 4: 1902–1912.
5. Bose I., Reese A.J., Ory J.J., Janbon G., Doering T.L. (2003) A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 2: 655–663.
6. Casadevall, A., Mukherjee, J., and Scharff, M.D. (1992) Monoclonal antibody based ELISAs for cryptococcal polysaccharide. *J Immunol Methods* 154: 27–35.
7. Casadevall, A., Steenbergen, J.N. & Nosanchuk, J.D. (2003) ‘Ready made’ virulence and ‘dual use’ virulence factors in pathogenic environmental fungi—the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr Opin Microbiol* 6:332–337.
8. Chang Y.C. and Kwon-Chung K.J. (1994) Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol. Cell Biol.*14:4912–19.
9. Chaturvedi V. and Chaturvedi S. (2011) *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. *Trends in Microbiology* 19: 564-71.
10. Chowdhury, S., Smith K.W. and Gustin M.C., (1992) Osmotic stress and the yeast cytoskeleton: phenotype-specific suppression of an actin mutation. *J. Cell Biol* 118: 561–571.
11. Cooper JA. (2002) Actin dynamics: Tropomyosin provides stability. *Current Biology* 12: 523–525.
12. Cox, G.M., Mukherjee, J., Cole, G.T., Casadevall, A., and Perfect, J.R. (2000) Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun* 68: 443–448.
13. David M., Gabriel M. and Kopecká M. (2007) Cytoskeletal structures, ultrastructural characteristics and the capsule of the basidiomycetous yeast *Cryptococcus laurentii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 92: 29-36.
14. Del Poeta M. (2004) Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 3: 1067–75
15. Doering, T.L. (2009) How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Microbiol* 63: 223–247
16. Drees, B., Brown C., Barrell, B.G. and Retscher, A. (1995) Tropomyosin Is Essential in Yeast, Yet the TPM1 and TPM2 Products Perform Distinct Functions. *The Journal of Cell Biology* 128: 383-392.

17. Ezaki B., Nakakihara E. (2012). Possible involvement of GDI1 protein, a GDP dissociation inhibitor related to vesicle transport, in an amelioration of zinc toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 29: 17-24.
18. Fonseca F.L., Nimrichter L., Cordero R.J., Frases S., Rodrigues J., Goldman D.L., Andruszkiewicz R., Milewski S., Travassos L.R., Casadevall A. and Rodrigues M.L. (2009) Role for chitin and chitooligomers in the capsular architecture of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 8: 1543-53.
19. Fonseca, F.L., Nohara, L.L., Cordero, R.J., Frases, S., Casa-devall, A., Almeida, I.C., *et al.* (2010) Immunomodulatory effects of serotype B glucuronoxylomannan from *Cryptococcus gattii* correlate with polysaccharide diameter. *Infect Immun* 78: 3861–3870.
20. Frases S., Nimrichter L., Viana N.B., Nakouzi A. and Casadevall A. (2008) *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide and exopolysaccharide fractions manifest physical, chemical, and antigenic differences. *Eukaryot. Cell* 7: 319-27.
21. Fromtling R.A., Shadomy H.J. and Jacobson E.S. (1982) Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 79:23–29.
22. Fuchs B.B., Tang R.J. and Mylonakis E. (2007) The temperature-sensitive role of *Cryptococcus neoformans* ROM2 in cell morphogenesis. *PLoS One* 2: e368.
23. Gabriel M., Horky´ D., Svoboda A. *et al* (1998) Cytochalasin D interferes with contractile actin ring and septum formation in *Schizosaccharomyces japonicus* var. *versatilis* . *Microbiology* 144: 2331-2344.
24. Galletta B.J., Mooren O.L. and Cooper J.A. (2010) Actin dynamics and endocytosis in yeast and mammals. *Current Opinion in Biotechnology*. 21: 604-10.
25. Garcia-Pedrajas, M. D., Nadal M., Kapa L.B., Perlin M.H., Andrews D.L., and Gold S.E. (2008) DelsGate, a robust and rapid gene deletion construction method. *Fungal Genet Biol* 45: 379-388.
26. Holmes K.C., Tirion M., Popp D., Lorenz M., Kabsch W. and Milligan R.A. (1993) A comparison of the atomic model of F-actin with cryoelectron micrographs of actin and decorated actin. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 332: 15-22.
27. Kidd S.E., Chow Y., Mak S., Bach P.J., Chen H., Hingston A.O., Kronstad J.W. and 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. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 1433-1443.
28. Kilmartin J.V. and Adams A.E. (1984) Structural rearrangements of tubulin and actin during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces*. *J Cell Biol* 98: 922-933.
29. Kopecka, M., M. Gabriel, K. Takeo, M. Yamaguchi, A. Svoboda, M. Ohkusu, K. Hata, and S. Yoshida (2001) Microtubules and actin cytoskeleton in *Cryptococcus neoformans* compared with ascomycetous budding and fission yeasts. *Eur J Cell Biol* 80: 303-311.
30. Koziol S., Zagulski M., Bilinski T., Bartosz G. (2005). Antioxidants protect the yeast *Saccharomyces cerevisiae* against hypertonic stress. *Free Radic Res.* 39: 365-71.

31. Lesage G. and Bussey H. (2006) Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70: 317–343.
32. Liu, H.P. and Bretscher A. (1989) Disruption of the Single Tropomyosin Gene in Yeast Results in the Disappearance of Actin Cables from the Cytoskeleton. *Cell* 57: 233-42.
33. Liu, HP. and Bretscher A. (1992) Characterization of TPM1 disrupted yeast cells indicates an involvement of tropomyosin in directed vesicular transport. *J Cell Biol* 118: 285-99.
34. Luberto C, Martinez-Mariño B, Taraskiewicz D, Bolaños B, Chitano P, Toffaletti DL, Cox GM, Perfect JR, Hannun YA, Balish E, Del Poeta M. (2003) Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest.* 112: 1080-9
35. Ma, H. and May R. C. (2009) Virulence in *Cryptococcus* species. *Adv Appl Microbiol* 67: 131-190.
36. Manning B.D., Padmanabha R. and Snyder M. (1997) The Rho-GEF Rom2p localizes to sites of polarized cell growth and participates in cytoskeletal functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 8: 1829-44.
37. Monari C., Bistoni F., Casadevall A., Pericolini E., Pietrella D., *et al.* (2005) Glucuronoxylomannan, a microbial compound, regulates expression of costimulatory molecules and production of cytokines in macrophages. *J Infect Dis* 191: 127-37.
38. Moseley, J.B. and Goode B.L. (2006) The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 605-645.
39. Nimrichter, L., M. L. Rodrigues, E. G. Rodrigues, and L. R. Travassos. 2005. The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. *Microbes Infect.* 7:789-798.
40. Nimrichter, L., Frases, S., Cinelli, L.P., Viana, N.B., Nakouzi, A., Travassos, L.R., *et al* (2007) Self-aggregation of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan is dependent on divalent cations. *Eukaryot Cell* 6: 1400-1410.
41. Oliveira, D.L., Nakayasu, E.S., Joffe, L.S., Guimaraes, A.J., Sobreira, T.J., Nosanchuk, J.D., *et al* . (2010a) Biogenesis of extracellular vesicles in yeast: many questions with few answers. *Commun Integr Biol* 3: 533–535.
42. Oliveira D.L., Freire-de-Lima C.G., Nosanchuk J.D., Casadevall A., Rodrigues M.L. and Nimrichter L. (2010b) Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infect Immun.* 78: 1601-9.
43. Payne, M.R., and Rudnick S.E. (1985) Tropomyosin, structural and functional diversity. *Cell Muscle Motil* 6: 141-184.
44. Phillips G.N. Jr, Lattman E.E., Cummins P., Lee K.Y. and Cohen C. (1979) Crystal structure and molecular interactions of tropomyosin. *Nature* 278: 413-7.
45. Pollack R., Osborn M. and Weber K. (1975) Patterns of organization of actin and myosin in normal and transformed cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 994-8.
46. Pruyne D. and Bretscher A. (2000) Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci.* 113: 571-85.
47. Robinson BE, Hall NK, Bulmer GS, Blackstock R. (2007) Suppression of responses to cryptococcal antigen in murine cryptococcosis.

48. Rodrigues, M.L., Rozental S., Couceiro J.N.N., Angluster J., Alviano C.S. and Travassos L.R.. (1997) Identification of N-acetylneuraminic acid and its 9- O-acetylated derivative on the cell surface of *Cryptococcus neoformans*: influence on fungal phagocytosis. *Infect. Immun.* 65: 4937-4942.
49. Rodrigues M.L., Alvarez M., Fonseca F.L. and Casadevall A. (2008) Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* suggests an association of chitinlike structures with yeast budding and capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryot Cell.* 7: 602-9.
50. Rodrigues M.L., Nimrichter L., Oliveira D.L., Frases S., Miranda K., Zaragoza O., Alvarez M., Nakouzi A., Feldmesser M. and Casadevall A. (2007) Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot Cell.* 6:48–59.
51. Rodrigues M.L., Nakayasu E.S., Oliveira D.L., Nimrichter L., Nosanchuk J.D., Almeida I.C. and Casadevall A. (2008) Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* 7: 58-67.
52. Sellers B., Hall P., Cine-Gowdie S., Hays A.L., Patel K., Lockhart S.R., Franco-Paredes C (2012) *Cryptococcus gattii*: An Emerging Fungal Pathogen in the Southeastern United States. *The American Journal of the Medical Science* 343: 510-1.
53. Shen, G., Whittington A., Song K. and Wang P. (2010) Pleiotropic function of intersectin homologue Cin1 in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 76: 662-676.
54. Shen G., Whittington A. and Wang P. (2011) Wsp1, a GBD/CRIB domain-containing WASP homolog, is required for growth, morphogenesis, and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 10: 521-9.
55. Shen G., Zhou E., Alspaugh J.A. and Wang P. (2012) Wsp1 is downstream of Cin1 and regulates vesicle transport and actin cytoskeleton as an effector of Cdc42 and Rac1 in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 11: 471-481.
56. Skoumpla K., Coulton A.T., Lehman W., Geeves M.A. and Mulvihill D.P. (2007) Acetylation regulates tropomyosin function in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 120: 1635-45.
57. Tang, N. and Ostap, E.M. (2001) Motor domain-dependent localization of myo1b (myr-1). *Current Biology* 11: 1131-1135.
58. Toffaletti, D.L., Rude, T.H., Johnston, S.A., Durack, D.T., Perfect, J.R., (1993) Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *J. Bacteriol.* 175: 1405-1411.
59. Zaragoza, O., Telzak, A., Bryan, R.A., Dadachova, E., and Casadevall, A. (2006) The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding. *Mol Microbiol* 59: 67-83.
60. Waugh M.S., Nichols C.B., DeCesare C.M., Cox G.M., Heitman J., *et al.* (2002) Ras1 and Ras2 contribute shared and unique roles in physiology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 148: 191-201.
61. Wertman, K.F., Rubin D.G.D and Botstein D., (1992) Systematic mutational analysis of the yeast ACT1 gene. *Genetics* 132: 337-350.
62. Zaragoza, O., Rodrigues, M. L., De Jesus M., Frases S., Dadachova E. and Casadevall A. (2009) The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv. Appl. Microbiol.* 68: 133-216.

63. Yamamoto T., Mochida J., Kadota J., Takeda M., Bi E., Tanaka K. (2010) Initial polarized bud growth by endocytic recycling in the absence of actin cable-dependent vesicle transport in yeast. *Mol Biol Cell.* 21: 1237-52.
64. Yoneda A. and Doering T.L. (2006) A eukaryotic capsular polysaccharide is synthesized intracellularly and secreted via exocytosis. *Mol. Biol. Cell.* 17: 5131-40.

5. DISCUSSÃO

As células necessitam de uma mudança rápida e contínua de sua morfologia celular em função dos mais diversos estímulos internos e externos às quais são submetidas. Para sobreviver em seus hospedeiros, microrganismos sofrem continuamente processos morfogenéticos para modificar seu tamanho, forma e volume frente às condições encontradas em diferentes ambientes (Ballou *et al.*, 2010). Em fungos, processos como endocitose, citocinese, polaridade celular, morfogênese, requerem um contínuo remodelamento de citoesqueleto (Shen *et al.*, 2011). Uma vez que leveduras patogênicas como *Cryptococcus* sp, necessitam se adaptar constantemente a diferentes ambientes e se defender de agressões do hospedeiro que promovem sua eliminação, o citoesqueleto torna-se um importante fator para o remodelamento, divisão celular e endocitose e exocitose de componentes nesta levedura. Assim, no presente estudo foi construída uma linhagem mutante para a proteína tropomiosina, uma importante proteína associada à actina de *C. gattii*, com o objetivo de estabelecer sua participação na formação da cápsula polissacarídica, morfologia e adaptação da levedura ao hospedeiro.

Estudos realizados em *S. cerevisiae* revelaram que a ausência de tropomiosina na levedura resulta em uma taxa de crescimento alterada, mudanças no fenótipo e também, impede a reprodução sexual (Liu & Bretscher, 1992). Mutantes de *C. gattii* para tropomiosina revelaram células com morfologia hiperalongada, formando aglomerados, quando comparadas às

células WT. Defeitos similares foram observados em *C. neoformans* e *S. cerevisiae*, em mutantes para *rom2* e Rho-GTPases, conhecidas por controlar eventos morfogênicos (Manning *et al.*, 1997; Fuchs *et al.*, 2007; Ballou *et al.*, 2010). No entanto, pelo fato da tropomiosina estar associada à actina em eventos ligados à formação do anel citocinético, o presente resultado sugere que a ausência desta proteína em *C. gattii* prejudica este evento, e devido a este fator não ocorre divisão das células-mãe com o broto que está sendo formado.

O citoesqueleto de actina possui uma função vital na resposta a fatores estressantes. Alguns agentes estressores induzem uma transiente e reversível desorganização da actina e muitos mutantes para actina exibem sensibilidade a osmoestressores (Chowdhury *et al.*, 1992; Wertman *et al.*, 1992). Nichols *et al.* (2007) recentemente demonstraram que temperaturas elevadas encontradas no hospedeiro causam uma despolarização temporária de actina em *C. neoformans*, sendo que células tipo selvagem rapidamente repolarizam e continuam o brotamento. Em *C. gattii* mutantes para tropomiosina demonstraram uma severa redução da capacidade de crescimento *in vitro* a 37°C, e também defeitos de tolerância a outros agentes estressantes como ZnCl₂ e NaCl, ficando assim evidências da participação da tropomiosina na termotolerância, e na resistência a toxicidade por metais e estressores osmóticos.

A célula necessita uma orientação e localização ordenada de suas organelas e material genético possuindo, o citoesqueleto, funções importantes na manutenção e orientação do seu conteúdo. Uma vez apontadas alterações morfológicas em mutantes nulos de tropomiosina, torna-se importante a

localização nuclear nas células com morfologia hiperalongada. De acordo com os resultados apresentados neste estudo, ficou evidente que a distribuição de material genético em mutantes de tropomiosina é alterada. Uma vez que a participação do citoesqueleto é importante na organização do conteúdo celular, sugere-se que a tropomiosina pode desempenhar funções essenciais para divisão do material genético e/ou para o direcionamento e localização deste material, no entanto os mecanismos desta participação ainda devem ser esclarecidos na levedura *C. gattii*.

Kopecká *et al.* (2001) descreveram a estrutura e organização da actina e microtúbulos de *C. neoformans*. Neste estudo semelhante a *S. cerevisiae*, marcações para F-actina revelaram uma distribuição de actina, em pontos corticais, cabos, e um anel citocinético para *C. neoformans*. Os pontos são acumulados nas regiões de crescimento como no sterigma, broto e septo. Nas células mãe os pontos de F-actina eventualmente são visualizados junto com os cabos, os quais são direcionados para o sterigma crescente e para o broto nascente, e, alguns associados ao núcleo. Tendo em vista que a tropomiosina está associada aos cabos de actina não se sabe ao certo se mutantes de *C. gattii* para tropomiosina poderiam apresentar algum defeito na orientação de conteúdo celular executada pelos cabos de actina. No entanto, uma vez que muitas proteínas acessórias são essenciais para o funcionamento do citoesqueleto e pouco se sabe sobre essa organização no patógeno *C. gattii*, torna-se importante o estudo desses fatores. Em nosso estudo enquanto células WT demonstraram uma localização de F-actina característica de *Cryptococcus* sp., mutantes de tropomiosina exibiram F-actina concentrada na periferia da célula. A tropomiosina desempenha papel crucial na estabilidade

da actina, esse papel ficou evidente em *C. gattii*, uma vez que os mutantes foram incapazes de manter uma localização de actina semelhante às células selvagens (Figura 3). Estes dados reforçam que há uma participação da tropomiosina na integridade do citoesqueleto celular de *C. gattii*, porém o mecanismo desta participação não está completamente elucidado nesta levedura

Durante o brotamento, ocorre a formação de um anel de quitina entre a célula-mãe e o broto nascente, o qual permanece na célula-mãe após a citocinese (Lesage & Bussey, 2006). Em *C. neoformans*, a síntese de quitina é relacionada ao crescimento celular, integridade da parede celular e montagem da cápsula polissacarídica, importantes fatores para a patogenicidade da levedura (Baker *et al.*, 2007; Banks *et al.*, 2005; Fonseca *et al.*, 2009). Uma vez que mutantes de tropomiosina apresentam severos defeitos morfológicos e incapacidade de divisão celular, foi avaliada a distribuição de quitina nas células. Mutantes *tpm1* apresentaram uma deposição anormal de quitina. Nas células com fenótipo hiperalongado constataram-se massas densas e irregulares de quitooligômeros distribuídas somente em alguns pontos das células próximos uns aos outros, enquanto outros compartimentos não apresentam resíduos de quitina (Figura 3F). Portanto, esses dados demonstram um papel de tropomiosina na distribuição do conteúdo da parede celular. No presente estudo sugerimos que esta distribuição irregular do conteúdo de quitina na célula pode ser consequência da formação alterada dos cabos de actina (responsáveis por direcionar os conteúdos celulares), uma vez que a tropomiosina encontra-se associada a estes cabos e possui a função de estabilizar a actina durante o processo de formação dos cabos.

A cápsula polissacarídica é definida como o maior fator de virulência de *Cryptococcus* sp (Fromtling *et al.*, 1982; Chang & Kwon-Chung, 1994; Doering, 2009; Del Poeta, 2004). A produção do polissacarídeo capsular GXM, assim como sua secreção para o ambiente extracelular, é crucial para virulência de *Cryptococcus*, uma vez que, linhagens com defeitos na sua produção ou secreção possuem fenótipo avirulento (Zaragoza *et al.*, 2009). A presença desse polissacarídeo nos tecidos e secreções do hospedeiro pode gerar uma série de efeitos deletérios durante a infecção, inclusive na ausência do patógeno (Vecchiarelli, 2000). Isto demonstra que para exercer sua patogenicidade a levedura deve apresentar uma integridade não somente no processo de produção deste polissacarídeo, mas também na sua secreção.

Em fungos o processo de secreção de proteínas, pigmentos e lipídeos para o ambiente extracelular envolve muitos mecanismos ainda não esclarecidos (Rodrigues *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2010a, 2010b). A síntese de moléculas de GXM envolve o complexo de Golgi com posterior direcionamento das vesículas contendo o polissacarídeo até a superfície celular, onde são liberadas para o meio extracelular (Yoneda & Doering, 2006). Contudo, um estudo realizado por Rodrigues e colaboradores (2007) propôs um novo mecanismo para a liberação de moléculas de GXM, onde, após a saída do compartimento *trans* Golgi, vesículas contendo o polissacarídeo atravessam a parede celular de *Cryptococcus* e se localizam extracelularmente. Com estes dados, supõem-se que a integridade do citoesqueleto especialmente dos cabos de actina e da manutenção da morfologia da célula, é crucial para exercer este mecanismo de secreção, sendo importante tanto para produção como para o direcionamento destas

moléculas até o córtex celular para posterior extrusão. A parede celular de fungos desempenha um papel importante para muitos processos biológicos como, forma, morfogênese e reprodução (Ninrichter *et al.*, 2005). Uma vez que vesículas contendo fatores de virulência como lipídeos e polissacarídeos podem chegar ao meio extracelular atravessando a parede celular fúngica (Rodrigues *et al.*, 2007), torna-se essencial a integridade deste componente celular para controle dos eventos de secreção. Neste contexto, avaliamos se os defeitos causados em células *tpm1Δ* podem afetar a secreção de vesículas contendo GXM e a formação de cápsula polissacarídica de *C. gattii*. Houve uma diminuição considerável no tamanho da cápsula das leveduras mutantes para tropomiosina a partir de 8h de cultivo (Figura 4) estando portanto, o principal fator de virulência responsável por proteger da fagocitose, diminuído na levedura. Pelo fato da simples presença de moléculas de GXM serem deletérias ao hospedeiro, especulamos os níveis deste polissacarídeo no sobrenadante do cultivo da levedura para verificar se a diminuição da cápsula na célula leveduriforme era consequência da diminuição da produção destas moléculas ou mesmo acúmulo das mesmas no ambiente intracelular. Curiosamente, os níveis do polissacarídeo GXM secretados no sobrenadante do cultivo foram maiores, quando comparados ao WT, demonstrando que a mutação de *tpm1* de *C. gattii* não prejudica a produção de moléculas e a secreção de vesículas. Uma vez que os polissacarídeos capsulares são produzidos intracelularmente, secretados para o meio extracelular e posteriormente agregados à célula para formação da cápsula, sugere-se que tropomiosina desempenha um papel na agregação dos polissacarídeos à célula e não na sua produção ou na secreção de vesículas contendo este material.

C. gattii R265 apresentou índices maiores de replicação intracelular em macrófagos quando comparados a outras linhagens de *C. gattii*, podendo este fator relacionado à sua hipervirulência (Ma & May, 2009). Segundo Luberto *et al* (2003), dentro de células fagocíticas *Cryptococcus* pode migrar dentro de células fagocíticas, de focos primários de infecção para outros órgãos, fato que permite sua disseminação e escape do sistema imune do seu hospedeiro. Este mecanismo é conhecido como “cavalo de Tróia”. Uma vez que a fagocitose é um importante determinante na patogenia de *Cryptococcus*, o índice de sobrevivência em macrófagos das linhagens mutante e selvagem foi avaliado. A linhagem *tpm1Δ* foi mais eficientemente fagocitada e morta pelos macrófagos, o que demonstra uma sensibilidade aumentada pela ausência de tropomiosina, porém este perfil deve sugerir-se que este ensaio seja conduzido com outros fagócitos, uma vez que a levedura apresentou-se sensível a 37°C (temperatura de realização do ensaio de fagocitose com os macrófagos). Ao avaliar a virulência *in vivo*, os resultados mostraram um perfil avirulento para mutantes *tpm1Δ* em 30 dias após a infecção. Muitos fatores observados na linhagem mutante poderiam explicar o aumento de sensibilidade a fagocitose e a ausência da capacidade de virulência na levedura. Uma importante característica observada foi a diminuição da habilidade de crescimento a 37°C, portanto, não se sabe se o aumento de sensibilidade à fagocitose e o perfil avirulento observado no presente estudo pode ser devido a este fator, uma vez que os ensaios conduzidos *in vitro* e *in vivo* possuem esta temperatura, ou se algum outro processo regulado pela tropomiosina promove este fenótipo. Outra importante evidência foi a diminuição da produção de cápsula polissacarrídica que pode estar diminuindo o perfil de resistência a fagocitose

in vivo, assim como *in vitro* foi observado. Nossos resultados demonstram que a ausência do gene da tropomiosina em *C. gattii*, afeta a morfologia celular, formação da cápsula polissacarídica e virulência da levedura, porém os mecanismos pelos quais estas deficiências ocorrem devem ser confirmados por outras metodologias.

6. CONCLUSÕES

- Morfologia e divisão celular de *Cryptococcus gattii* são dependentes de tropomiosina.
- Ausência da tropomiosina altera a localização e função de componentes de citoesqueleto.
- A tropomiosina influencia a localização de DNA nuclear.
- A formação de cápsula polissacarídica é dependente de tropomiosina.
- Ausência do gene da tropomiosina em *C. gattii* afeta a virulência da levedura.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarez M., Casadevall A. (2006). Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol* 16: 2161-2165.
2. Adams, A.E., Botstein D., and Drubin D.G. (1989) A yeast actin-binding protein is encoded by SAC6, a gene found by suppression of an actin mutation. *Science* 243: 231–233.
3. Amatruda, J.F., Cannon J.F., Tatchell K, Hug C., and Cooper J.A. (1990) Disruption of the actin cytoskeleton in yeast capping protein mutants. *Nature* 344: 352–354
4. Amberg, D.C., Zahner J.E., Mulholland J.M., Pringle J.R., and Botstein D. (1997) Aip3p/Bud6p, a yeast actin-interacting protein that is involved in morphogenesis and the selection of bipolar budding sites. *Mol.Biol.Cell* 8: 729–753.
5. Amberg, D.C. (1998). Three-dimensional imaging of the yeast actin-cytoskeleton through the budding cell-cycle. *Mol. Biol. Cell* 9: 3259-3262.
6. Baker, L.G., Specht, C.A., Donlin, M.J., and Lodge, J.K. (2007). Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 6: 855–867.
7. Balasubramanian, M.K., Bi E., and Glotzer, M. (2004). Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr. Biol.* 14: R806-R818.
8. Balcer, H.I., Goodman, A.L., Rodal, A.A., Smith, E., Kugler, J., Heuser, J.E., and Goode, B.L. (2003). Coordinated regulation of actin filament turnover by a high-molecular-weight Srv2/CAP complex, cofilin, profilin, and Aip1. *Curr. Biol.* 13: 2159-2169.
9. Ballou, E. R., Nichols, C.B., Miglia, K.J., Kozubowski, L., and Alspaugh, J.A. (2010). Two CDC42 paralogues modulate *Cryptococcus neoformans* thermotolerance and morphogenesis under host physiological conditions. *Mol Microbiol.* 75: 763-780.
10. Banks, I.R., Specht, C.A., Donlin, M.J., Gerik, K.J., Levitz, S.M., and Lodge, J.K. (2005). A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 4: 1902-1912.

11. Bartlett, K.H., Kidd, S.E, and Kronstad, J.W. (2008). The emergence of *Cryptococcus gattii* in British Columbia and the Pacific Northwest. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 10: 58-65.
12. Bernstein, B. W. and Bamberg J.R. (1982). Tropomyosin binding to F-actin protects the F-actin from disassembly by brain actin-depolymerizing-factor (ADF). *Cell Motil.* 2: 1-8.
13. Bi, E. (2001). Cytokinesis in budding yeast: the relationship between actomyosin ring function and septum formation. *Cell Struct. Funct.* 26: 529-537.
14. Blanchoin, L., Pollard T.D., Hitchcock-DeGregori S.E. (2001) Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerization and branch formation by tropomyosin. *Curr. Biol.* 11: 1300–1304.
15. Bovers, M., Hagen, F., Boekhout, T. (2008). Diversity of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. *Rev Iberoam Micol.* 25: S4-12.
16. Bretscher, A. (2003). Polarized growth and organelle segregation in yeast: the tracks, motors, and receptors. *J. Cell Biol.* 160: 811-816.
17. Broschat, K.O., Weber, A. and Burgess, D.R. (1989). Tropomyosin stabilizes the pointed end of actin filaments by slowing depolymerization. *Biochemistry* 28:8501-8506.
18. Casadevall, A., Steenbergen, J.N., Nosanchuk, J.D. (2003). 'Ready-made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi – the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr Opin Microbiol.* 6: 332-337.
19. Casadevall, A., Perfect, J.R. (1998). *Cryptococcus neoformans*. Washington: American Society for Microbiology Press. 541.
20. Chaturvedi V., Chaturvedi S. (2011). *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. *Trends Microbiol.* 19:564-71.
21. Chang, Y.C., and Kwon-Chung, K.J. (1994). Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol. Cell Biol.* 14: 4912-19.
22. Chen, W., Wen K.K., Sens A.E., and Rubenstein P.A. (2006). Differential interaction of cardiac, skeletal muscle, and yeast tropomyosins with fluorescent (pyrene 235) yeast actin. *Biophys. J.* 90: 1308-1318.
23. Cooper J.A. (2002). Actin dynamics: Tropomyosin provides stability. *Current Biology.* 12: R523-R525.
24. Costa, P., Lazéra, M.S., Santos, W.R., Morales, B.P., Bezerra, C.C., Nishikawa, M.M., Barbosa, G.G., Trilles, L., Nascimento, J.L., Wanke, B. (2009). First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city of Belém, Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104: 662-4.
25. Cox, G.M., Mukherjee, J., Cole, G.T. Casadevall, A., and Perfect, J.R. (2000). Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun.* 68: 443-448.

26. David, M., Gabriel M., Kopecká, M. (2007). Cytoskeletal structures, ultrastructural characteristics and the capsule of the basidiomycetous yeast *Cryptococcus laurentii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 92: 29-36.
27. Del Poeta, M. (2004). Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 3: 1067-75.
28. Dixit, A., Carroll, S.F., Qureshi S.T. (2009). *Cryptococcus gattii*: An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2009: 840452.
29. Doering, T.L. (2000). How does *Cryptococcus* get its coat? *Trends Microbiol*. 8: 547-553.
30. Doering, T.L. (2009). How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Microbiol* 63: 223–247.
31. 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. *MBio*.2: 00342-10.
32. Eisenman, H.C., Frases, S., Nicola, A.M., Rodrigues, M.L., Casadevall, A. (2009). Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*. 155: 3860-7.
33. Engqvist-Goldstein, A.E., and Drubin, D.G. (2003). Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 19: 287-332.
34. Evangelista, M., Pruyne D., Amberg D.C., Boone C., and Bretscher A. (2002) Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat Cell Biol*. 4: 32–34.
35. Evangelista, M., Blundell K., Longtine M.S., Chow C.J., Adames N., Pringle J.R., Peter M., and Boone C. (1997) Bni1p, a yeast formin linking Cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* 276: 118–122.
36. Feldmesser, M., Kress, Y., Novikoff, P., Casadevall, A. (2000). *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect Immun*. 68: 4225-37.
37. Feldmesser, M., Tucker, S., Casadevall, A. (2001). Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol* 9: 273-278.
38. Fonseca, F.L., Nimrichter, L., Cordero, R.J., Frases, S., Rodrigues, J., Goldman, D.L., Andruszkiewicz, R., Milewski, S., Travassos, L.R., Casadevall, A., Rodrigues, M.L. (2009). Role for chitin and chito oligomers in the capsular architecture of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 8: 1543-53.

39. 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.
40. Frases, S., Pontes, B., Nimrichter, L., Viana, N.B., Rodrigues, M.L., Casadevall, A. (2009). Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106: 1228-33.
41. Fromtling, R.A., Shadomy, H.J., Jacobson, E.S. (1982). Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia.* 79: 23-29.
42. Galanis, E., Macdougall, L. (2010). Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. *Emerg. Infect. Dis.* 16: 251-257.
43. Galletta BJ, Mooren OL, Cooper JA. (2010) Actin dynamics and endocytosis in yeast and mammals. *Curr Opin Biotechnol.* 21: 604-10.
44. Garcia, J., Shea, J., Alvarez-Vasquez, F., Qureshi, A., Luberto, C., Voit, E.O., Del Poeta, M. (2008). Mathematical modeling of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Syst Biol.* 4: 183.
45. Garcia-Rivera, J., Chang, Y.C., Kwon-Chung, K.J., Casadevall, A. (2004). *Cryptococcus neoformans* CAP59 (or Cap59p) is involved in the extracellular trafficking of capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryot. Cell* 3: 385–392.
46. Goulart, L., Rosa e Silva, L.K., Chiapello, L., Silveira, C., Crestani, J., Masih, D., Vainstein, M.H. (2010) *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* genes preferentially expressed during rat macrophage infection. *Med Mycol.* 48: 932-41.
47. Gourlay, C.W., Carpp, L.N., Timpson, P., Winder, S.J., Ayscough, K.R. (2004). A role for the actin cytoskeleton in cell death and aging in yeast. *J. Cell Biol.* 164: 803-809.
48. Haarer, B.K., Lillie S.H, Adams A.E.M., Magdolen V., Bandlow W., and Brown S.S. (1990) Purification of profilin from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of profilin-deficient cells. *J Cell Biol.* 110: 105–114.
49. Holmes, K.C., Tirion, M., Popp, D., Lorenz, M., Kabsch, W., Milligan, R.A. (1993). A comparison of the atomic model of F-actin with cryoelectron micrographs of actin and decorated actin. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 332: 15-22.
50. Jain, N., Li, L., McFadden, D.C., Banarjee, U., Wang, X., Cook, E., Fries, B.C. (2006). Phenotypic switching in a *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* strain is associated with changes in virulence and promotes dissemination to the central nervous system. *Infect Immun* 74: 896-903.
51. Janbon, G. (2004). *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. *FEMS Yeast Res* 4: 765-771.
52. 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 USA. 101: 17258-63.
53. Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E. (1984). Epidemiologic differences between the two varieties *Cryptococcus neoformans*. Am. J. Epidemiol. 120: 123-130.
 54. Kopecka, M., Gabriel, M., Takeo, K., Yamaguchi, M., Svoboda, A., Ohkusu, M., Hata, M., Yoshida, S. (2001). Microtubules and actin cytoskeleton in *Cryptococcus neoformans* compared with ascomycetous budding and fission yeasts. Eur J Cell Biol 80: 303-311.
 55. Kubler, E., Riezman H. (1993). Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. EMBO J. 12: 2855-2862
 56. Lappalainen, P. & Drubin, D.G. (1997). Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. Nature. 388: 78-82.
 57. Lesage, G. and Bussey, H. (2006). Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev. 70: 317-343.
 58. Li, R. (1997). Bee1, a yeast protein with homology to Wiskott-Aldrich syndrome protein, is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton. J. Cell Biol. 136: 649-658.
 59. Lin, X., Heitman, J. (2006). The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. Annu Rev Microbiol. 60:69-105.
 60. Liu, H.P., and Bretscher, A. (1989). Disruption of the single tropomyosin gene in yeast results in the disappearance of actin cables from the cytoskeleton. Cell 57: 233-242.
 61. Luberto, C., Martinez-Mariño, B., Taraskiewicz, D., Bolaños, B., Chitano, P., Toffaletti, D.L., Cox, G.M., Perfect, J.R., Hannun, Y.A., Balish, E., Del Poeta, M. (2003). Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Invest. 112: 1080-94.
 62. Ma, H., Croudace, J.E., Lammas, D.A., May, R.C. (2006). Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. Curr Biol 16: 2156-2160.
 63. Ma, H., & May, R.C. (2009). Virulence in *Cryptococcus* species. Adv Appl Microbiol 67: 131-190.
 64. Mak, S., Klinkenberg, B., Bartlett, K., & Fyfe, M. (2010). Ecological niche modeling of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada. Environ. Health Perspect. 118: 653-658.
 65. Martins, L.M., Wanke, B., Lazéra M.S., Trilles, L., Barbosa, G.G., Macedo, R.C., Cavalcanti, M.A., Eulálio, K.D., Castro, J.A., Silva, A.S., Nascimento, F.F., Gouveia, V.A., Monte, S.J. (2011). Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). Mem Inst Oswaldo Cruz. 106: 725-30.
 66. McFadden, D., Zaragoza, O. & Casadevall, A. (2006a). The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. Trends Microbiol. 14: 497–505.
 67. McFadden, D.C., De Jesus, M., and Casadevall, A. (2006). The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. J. Biol. Chem. 281: 1868-1875.

68. 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 multilocus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol.* 47: 561-70.
69. Mitchell, D. H., Sorrell, T.C., Allworth, A.M., Heath, C.H. McGregor, A.R., Papanicolaou, 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: 611-616.
70. Moon, A.L., Janmey, P.A., Louie, K.A. & Drubin, D. (1993). Cofilin is an essential component of the yeast cortical cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 120: 421-435.
71. Moseley, B.J. & Goode, L.B. (2006). The Yeast Actin Cytoskeleton: from Cellular Function to Biochemical Mechanism. *Microbiol Mol Biol. Rev.* 70: 605-45.
72. Mulholland, J., Wesp, A., Riezman, H., Botstein, D. (1997). Yeast actin cytoskeleton mutants accumulate a new class of golgi-derived secretory vesicles. *J. Cell Biol.* 8: 1481-1499.
73. Nichols, C.B., Perfect, Z.H., Alspaugh, J.A. (2007) A Ras1-Cdc24 signal transduction pathway mediates thermotolerance in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* 63: 1118-1130
74. Nimrichter, L., Rodrigues, M.L., Rodrigues, E.G., Travassos, L.R. (2005). The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. *Microbes Infect.* 7: 789-798.
75. Nimrichter, L., Frases, S., Cinelli, L.P., Viana, N. B. Nakouzi, A., Travassos, L.R., Casadevall, A., Rodrigues, M.L. (2007). Self-aggregation of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan is dependent on divalent cations. *Eukaryot. Cell* 6: 1400-1410.
76. Oliveira, D.L., Nakayasu, E.S., Joffe, L.S., Guimaraes, A.J., Sobreira, T.J., Nosanchuk, J.D. (2010a). Biogenesis of extracellular vesicles in yeast: many questions with few answers. *Commun Integr Biol* 3: 533-535.
77. Oliveira, D.L., Nakayasu, E.S., Joffe, L.S., Guimaraes, A.J., Sobreira, T.J., Nosanchuk, J.D. (2010b). Characterization of yeast extracellular vesicles: evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis. *PLoS ONE.* 5: e11113.
78. Ono, S., and K. Ono. (2002). Tropomyosin inhibits ADF/cofilin-dependent actin filament dynamics. *J. Cell Biol.* 156: 1065-1076.
79. Perfect, J. R., & Casadevall, A. (2002). Cryptococcosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 16: 837-874
80. Perfect, J. R. (2005). *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 45: 395-404
81. Phillips, G.N. Jr., Lattman, E.E., Cummins, P., Lee, K.Y., Cohen, C. (1979) Crystal structure and molecular interactions of tropomyosin. *Nature.* 278: 413-7.

82. Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L., Dong, Y., Bretscher, A. (2004). Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 559–591.
83. Pruyne, D.W., Schott, D.H., Bretscher, A. (1998). Tropomyosin-containing actin cables direct the Myo2p-dependent polarized delivery of secretory vesicles in budding yeast. *J. Cell Biol.* 143: 1931-1945.
84. Raths, S., Rohrer, J., Crausaz, F., Riezman, H. (1993). End3 and end4: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 120: 55-65.
85. Riezman, H. (1985). Endocytosis in yeast: several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis. *Cell.* 40: 1001-1009.
86. Rodrigues, M. L., Nimrichter, L., Oliveira, D.O., Frases, S., Miranda, K., Zaragoza, O., Alvarez, M., Nakouzi, A., Feldmesser, M., Casadevall, A. (2007). Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot. Cell* 6: 48-59.
87. Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., Oliveira, D.L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J.D., Almeida, I.C. Casadevall, A. (2008). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* 7: 58-67.
88. Shen, G., Whittington, A., Wang, P. (2011). Wsp1, a GBD/CRIB domain-containing WASP homolog, is required for growth, morphogenesis, and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 10: 521-9.
89. Speed, B., & Dunt D. (1995). Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Infect. Dis.* 21:28–34.
90. Sweetser, M.T., Hoey, T., Sun, Y.L., Weaver, W.M., Price, G.A., Wilson, C.B. (1998). The roles of nuclear factor of activated T cells and ying-yang 1 in activation-induced expression of the interferon-gamma promoter in T cells. *J. Biol. Chem.* 273: 34775–34783.
91. Tang, N. & Ostap, E.M. (2001). Motor domain-dependent localization of myo1b (myr-1). *Current Biology.* 11: 1131-1135.
92. Tolliday, N., VerPlank, L., Li, R. (2002). Rho1 directs formin-mediated actin ring assembly during budding yeast cytokinesis. *Curr Biol.* 12: 1864-1870.
93. Tucker, S.C. & Casadevall, A. (2002). Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 99: 3165-3170.
94. Vecchiarelli, A. (2000). Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans*. *Med. Mycol.* 38: 407-417.
95. Vojtek, A., Haarer B., Field J., Gerst J., Pollard T.D., Brown S., and Wigler M. (1991) Evidence for a functional link between profilin and CAP in the yeast *S. cerevisiae*. *Cell* 66:497–505.

96. Zaragoza, O., Telzak, A., Bryan, R.A., Dadachova, E., Casadevall, A. (2006). The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding. *Mol. Microbiol.* 59: 67-83
97. Zaragoza, O., Rodrigues, M.L., De Jesus, M., Frases, S., Dadachova, E., and Casadevall, A. (2009). The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol.* 68: 133-216.
98. Yamamoto T., Mochida J., Kadota J., Takeda M., Bi E., Tanaka K. (2010). Initial polarized bud growth by endocytic recycling in the absence of actin cable-dependent vesicle transport in yeast. *Mol Biol Cell.* 2010 21: 1237-52.
99. Yauch, L.E., Mansour, M.K., Levitz, S.M. (2005). Receptor-mediated clearance of *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide in vivo. *Infect Immun.* 73: 8429-8432.
100. Yoneda, A., & Doering, T.L. (2006). A eukaryotic capsular polysaccharide is synthesized intracellularly and secreted via exocytosis. *Mol. Biol. Cell* 17: 5131-5140.