

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

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES REGULADOS PELA TEMPERATURA
NA LEVEDURA PATOGÊNICA *Cryptococcus neoformans***

Dissertação de Mestrado

Lívia Kmetzsch Rosa e Silva

Porto Alegre, 2006.

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

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES REGULADOS PELA TEMPERATURA
NA LEVEDURA PATOGÊNICA *Cryptococcus neoformans***

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

Lívia Kmetzsch Rosa e Silva

Orientadora: Prof^{ta}. Dra. Marilene Henning Vainstein

Co-orientador: Prof. Dr. Augusto Schrank

Porto Alegre, 2006.

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

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Marilene Vainstein e Augusto Schrank, pela oportunidade, confiança e aprendizado.

Ao Charley por todo apoio, orientação e inúmeros ensinamentos, científicos e pessoais.

Ao Professor Dr. Arnaldo Zaha, membro da comissão de acompanhamento.

Ao Professor Dr. Henrique Ferreira pela revisão da redação científica.

Aos amigos e colegas dos laboratórios 218, 220 e 217 por todos os momentos compartilhados.

A Irina pela grande amizade e apoio.

Aos amigos e colegas dos laboratórios 222, Genoma, 204/206 e Laboratório de Fisiologia Vegetal.

Ao Laboratório de Seqüenciamento da Rede Sul de Análise de Genomas PIGS – Cbiot UFRGS.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, em especial ao Sr. Milton.

A minha família.

Aos meus amigos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	V
Resumo	VI
1. Introdução	1
1.1 Aspectos Gerais	2
1.2 <i>Cryptococcus neoformans</i> e Virulência	6
1.2.1 Cápsula polissacarídica	7
1.2.2 Síntese de melanina	9
1.2.3 Desenvolvimento a 37°C	10
1.3 O genoma de <i>Cryptococcus neoformans</i>	14
1.4 Estratégias para identificação de genes essenciais na virulência de <i>Cryptococcus neoformans</i>	16
2. Objetivos	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. Manuscrito: <i>Identification of Temperature-Regulated Genes in the Human Pathogen Cryptococcus neoformans</i>	21
4. Conclusões e Perspectivas	48
5. Referências bibliográficas	49

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus Celsius
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
cDNA	DNA complementar
CO ₂	dióxido de carbono
DNA	ácido desoxirribonucléico
ESTs	expressed sequence tags (marcadores de seqüências expressas)
GTP	guanosina tri-fosfato
h	hora
HIV	vírus da imunodeficiência humana
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
Mb	megabase
mL	mililitro
mRNA	RNA mensageiro
ng	nanogramas
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da DNA polimerase
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RT-MMLV	transcriptase reversa do vírus da leucemia Maloney de camundongos
spp	espécies
T-DNA	DNA de transferência
UV	ultravioleta
var	variedade
µg	microgramas
µl	microlitros

RESUMO

Cryptococcus neoformans é uma levedura basidiomicética e patógeno humano oportunista, que causa infecção tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em imunocompetentes. A habilidade de sobrevivência e proliferação na temperatura do corpo humano é um fator de virulência essencial deste microrganismo. Análise da Diferença Representacional (RDA) foi aplicada com o intuito de delinear o perfil de expressão gênica durante desenvolvimento de *C. neoformans* a 37°C ou 25°C. Análises de 300 seqüências de cDNA permitiram a identificação de proteínas que podem ser críticas para processos de interação patógeno-hospedeiro. Produtos gênicos envolvidos em integridade da parede celular, resposta ao estresse, filamentação e metabolismo oxidativo são induzidos a 37°C. Genes relacionados à silenciamento de cromatina e transporte de fosfolípidios possuem maior expressão em cultivo de *C. neoformans* a 25°C. A metodologia de RDA mostrou-se viável no intuito de identificar genes regulados pela temperatura neste organismo, os quais podem representar alvos potenciais para estudos de inibição do desenvolvimento de *C. neoformans* no hospedeiro.

1. INTRODUÇÃO

O estudo da genética e biologia molecular de *Cryptococcus neoformans* assumiu papel relevante nos últimos anos. De acordo com dados publicados em dezembro de 2005 pela Organização Mundial da Saúde e Programa HIV/AIDS das Nações Unidas, mais de 40 milhões de indivíduos estão infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), e aproximadamente três milhões vêm a óbito a cada ano, por complicações associadas à doença (Lin & Heitman, 2006). A meningite criptocócica é a infecção fúngica que mais acomete o sistema nervoso central, sendo a terceira complicação neurológica mais frequente em pacientes com AIDS (Del Valle & Pina-Oviedo, 2006). A levedura basidiomicética *C. neoformans* é o agente etiológico da doença, e pode também infectar, embora com uma menor incidência, indivíduos em tratamento com drogas imunossupressoras, ou pacientes com desordens linfoproliferativas (Ellis *et al.*, 2000).

C. neoformans tornou-se um modelo para estudos moleculares de mecanismos envolvidos no processo de patogenicidade em fungos. A disponibilidade da seqüência completa do genoma da levedura (Loftus *et al.*, 2005), aliada às análises de expressão gênica global e manipulação gênica têm proporcionado grandes avanços no que diz respeito à identificação de possíveis alvos para o desenvolvimento de drogas e vacinas. Aspectos relacionados à produção de uma cápsula polissacarídica, síntese de melanina, desenvolvimento a 37°C, rotas metabólicas, e uma variedade de rotas de sinalização têm sido investigados para um melhor entendimento da patogênese desta levedura em nível molecular (Perfect, 2005).

Neste contexto, o presente trabalho versa sobre a identificação de genes expressos por *C. neoformans* em função da temperatura. A metodologia de Análise da Diferença

Representacional (RDA) foi utilizada para a identificação de seqüências expressas diferencialmente em cultivo de *C. neoformans* a 37°C ou 25°C. A habilidade de desenvolvimento a 37°C é uma característica fundamental de fungos patogênicos humanos, representando um importante fator de virulência do sistema em questão.

1.1 Aspectos Gerais

C. neoformans foi descrito como patógeno humano em 1894 por Otto Busse e Abraham Buschke, isolado de uma lesão na tíbia. Um ano mais tarde, Sanfelice isolou uma levedura encapsulada a partir de suco de pêsego fermentado, e demonstrou a sua patogenicidade em animais de laboratório. A recuperação do microrganismo a partir de lesões de humanos e de animais, e seu isolamento do ambiente estabeleceram o potencial patogênico e a capacidade de vida livre, respectivamente. O cultivo de *C. neoformans* em condições laboratoriais e a determinação de sua patogenicidade em modelos de infecção experimental propiciaram avanços nos estudos deste patógeno (Casadevall & Perfect, 1998).

O complexo *C. neoformans* inclui leveduras basidiomicéticas que infectam o sistema nervoso central, pulmões e pele do hospedeiro. Atualmente, está classificado em três variedades e quatro sorotipos de acordo com características antigênicas da cápsula polissacarídica, apresentando diferentes distribuições geográficas e propriedades de virulência. *C. neoformans* var. *grubbi* (sorotipo A) (Franzot *et al.*, 1999) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) (Sorrell *et al.*, 1996) freqüentemente acometem indivíduos imunocomprometidos, tais como portadores do vírus HIV ou pacientes em tratamento com drogas imunossupressoras, e apresentam distribuição mundial (Casadevall & Perfect,

1998). *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C), recentemente referida como uma espécie, *Cryptococcus gattii* (Kwon-Chung *et al.*, 2002), tipicamente acomete indivíduos imunocompetentes. Esta espécie é considerada restrita a regiões de clima tropical e subtropical (Sorrell, 2001), porém há registros de uma epidemia de criptococose causada por *C. gattii* em Vancouver, Canadá, região de clima temperado (Kidd *et al.*, 2004).

Há diferenças significativas na apresentação clínica da doença em relação às infecções causadas por *C. neoformans* e *C. gattii*. A doença decorrente de infecção por *C. gattii* é caracterizada por uma alta incidência de criptocomas no pulmão e no cérebro, que necessitam, freqüentemente, de intervenção cirúrgica. Esta infecção apresenta uma alta morbidez neurológica e resposta retardada a terapia antifúngica. Já a criptococose causada por *C. neoformans* é associada a lesões pulmonares e cerebrais, os quais se apresentam como infiltrados mais difusos. Esta doença apresenta um maior índice de mortalidade em relação àquela causada por *C. gattii* (Mitchell & Perfect, 1995).

Atualmente, os medicamentos utilizados para o tratamento da criptococose são os antifúngicos anfotericina B e fluconazol, porém estes possuem efeitos tóxicos para o organismo do paciente. Além disso, o número de linhagens de *C. neoformans* resistentes tem aumentado, tornando-se necessária a descoberta de novos alvos para intervenção terapêutica da doença (Odom *et al.*, 1997; Sanguinetti *et al.*, 2006). O tratamento de enfermidades causadas por fungos é um desafio, uma vez que existem muitas similaridades entre a maquinaria celular de fungos e a humana, diminuindo-se, desta forma, a disponibilidade de drogas para o tratamento destas doenças, quando comparadas a doenças causadas por bactérias ou vírus (Idnurm *et al.*, 2005).

A presença ubíqua de *C. neoformans* no ambiente indica que a infecção humana é adquirida de fontes ambientais (Casadevall & Perfect, 1998). Os representantes dos

sorotipos A (var. *grubii*) e D (var. *neoformans*) geralmente são encontrados no solo e em excretas de aves, principalmente pombos (*Columba livia*), considerados a maior fonte ambiental destas variedades (Casadevall & Perfect 1998; Horta *et al.*, 2002; Casali *et al.*, 2004; Abegg *et al.*, 2006). *C. gattii* está predominantemente associado a árvores de eucaliptos (*Eucalyptus* spp.) e madeiras em decomposição (Sorrell, 2001).

C. neoformans é isolado tanto de pacientes quanto do ambiente na forma leveduriforme. Entretanto, esse microrganismo pode sofrer uma transição dimórfica, estabelecendo o desenvolvimento de hifas (forma filamentosa) por duas rotas de diferenciação distintas: *mating* e frutificação monocariótica (Figura 1). Ambas as vias levam a produção de possíveis partículas infecciosas, os basidiósporos (Idnurm *et al.*, 2005).

O ciclo sexual de *C. neoformans* (*mating*) envolve a fusão de células haplóides de *mating types* opostos, α e **a**, para a produção de filamentos dicarióticos (Kwon-Chung, 1976; Nielsen *et al.*, 2003). Estes sofrem meiose, levando à produção de basidiósporos. Sabe-se que o *mating type* está diretamente relacionado à virulência em *C. neoformans*. Estudos epidemiológicos em linhagens de *C. neoformans* var. *neoformans* mostraram que isolados clínicos possuem, em 96% dos casos, *mating type* α , sendo que as linhagens deste *mating type* são mais virulentas, quando comparadas a linhagens de *mating* oposto (**a**) (Kwon-Chung *et al.*, 1992). Em *C. neoformans* var. *grubii*, a maioria dos isolados clínicos também apresenta *mating type* α , e linhagens de *mating* α e **a** são igualmente virulentas (Nielsen *et al.*, 2003). Em *C. neoformans*, o ciclo sexual é controlado por mais de 20 genes organizados no locus *mating type* (*MAT*) (Lengeler *et al.*, 2002).

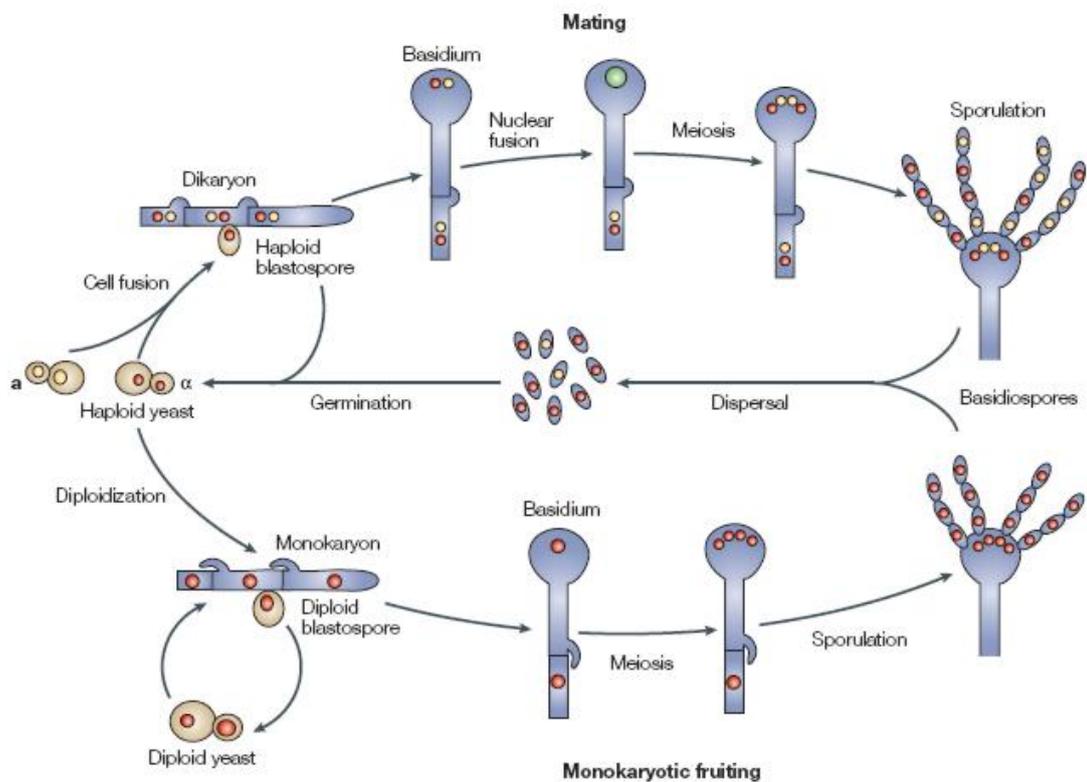


Figura 1. **Ciclo de vida em *C. neoformans***. Durante o ciclo sexual da levedura (*mating*) ocorre fusão de células leveduriformes haplóides de *mating types* opostos, α e **a**. Formam-se hifas dicarióticas, as quais sofrem um processo meiótico de divisão celular, resultando na produção de basidiósporos. Durante o processo de frutificação monocariótica, células de um mesmo *mating type* sofrem diploidização, formando hifas diplóides, e, após a meiose, basidiósporos haplóides são produzidos. Estas partículas, oriundas de ambos os processos, dispersam no ambiente, e em condições ideais de germinação, dão origem a leveduras haplóides. Adaptado de Idnurm *et al.*, 2005.

Durante o processo de frutificação monocariótica, células de um mesmo *mating* sofrem diploidização em resposta à limitação de nutrientes, ocorrendo, no final do processo, a formação de basidiósporos. Esta via foi recentemente reconhecida como uma forma de reprodução sexual, que pode ocorrer entre linhagens de um mesmo *mating type*

(Lin *et al.*, 2005). Estudos genotípicos de amostras de *C. gattii* relacionadas à epidemia de criptococose em Vancouver, Canadá (Kidd *et al.*, 2004), evidenciaram ocorrência de reprodução sexual entre linhagens de mating type α . Foram identificados isolados diplóides produzidos durante ciclo sexual entre linhagens de um mesmo mating (Fraser *et al.*, 2005). O aspecto mais curioso desse processo é a ocorrência predominante em linhagens de mating type α , podendo, assim, justificar a predominância deste mating type em amostras ambientais e clínicas (Tschärke *et al.*, 2003; Idnurm *et al.*, 2005).

A infecção por *C. neoformans* ocorre por inalação de partículas infecciosas, basidiósporos ou leveduras, presentes no ambiente. *Cryptococcus* pode colonizar o trato respiratório do hospedeiro sem causar doença. Há casos de infecção assintomática, com a permanência latente do microrganismo no corpo do indivíduo infectado. Em situações de comprometimento do sistema imune, a forma latente pode ser reativada, permitindo a proliferação do fungo e desenvolvimento de uma infecção sistêmica. Aliado a propensão à disseminação para o sistema nervoso central, podem ocorrer infecções localizadas na pele, olhos, coração, ossos, e trato urinário (Lin & Heitman, 2006).

1.2 *Cryptococcus neoformans* e Virulência

As infecções fúngicas podem ser consideradas como um pequeno desvio no ciclo natural de alguns fungos, os quais, na maioria das vezes, necessitam de determinantes que possibilitem seu desenvolvimento no hospedeiro. Estes determinantes são fatores de virulência, características que propiciam ao microrganismo transpor as defesas do indivíduo infectado. Em *C. neoformans*, existem três fatores bem estabelecidos: elaboração de uma

cápsula polissacarídica, produção de melanina e habilidade de desenvolvimento a 37°C (Figura 2; Casadevall & Perfect, 1998).

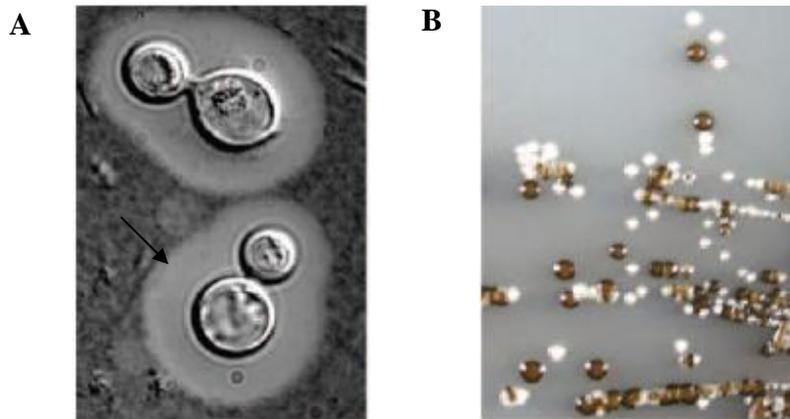


Figura 2. **Fatores de virulência em *C. neoformans***. (A) Coloração de células da levedura com tinta da China, evidenciando a presença de cápsula polissacarídica (indicada pela seta). (B) Colônias de *C. neoformans* (marrons) em contraste com colônias de *Candida albicans* (brancas), destacando a produção do pigmento melanina, em meio de cultura contendo compostos fenólicos. Adaptado de Idnurm *et al.*, 2005.

1.2.1 Cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica foi o primeiro fator de virulência de *C. neoformans* a ser associado à patogênese, e é considerada como um dos principais determinantes de virulência (Casadevall & Perfect, 1998). Sua composição é de aproximadamente 88% de glicuronoxilomanana (GXM) e 10% de galactoxilomanana. A cápsula está presente em isolados ambientais, e envolve a parede celular da célula fúngica, protegendo-a contra desidratação. Esta estrutura atua como uma barreira física, que interfere no processo de fagocitose e dificulta a ação do sistema imune do hospedeiro. Componentes da cápsula

inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, inativam componentes do sistema complemento, e reduzem a migração de leucócitos ao sítio de infecção (Bose *et al.*, 2003). Análises das propriedades imunossupressivas de GXM revelaram que este componente é capaz de induzir apoptose em células T do sistema imune do hospedeiro (Monari *et al.*, 2006).

A estrutura polissacarídica da cápsula é complexa, e sua biossíntese requer uma série de produtos gênicos (Doering, 2000). Estudos genéticos e de biologia molecular têm sido aplicados para elucidar os passos desta rota. Análises por complementação de mutantes de linhagens de *C. neoformans* desprovidas de cápsula possibilitaram a identificação de quatro genes necessários para a sua produção. Os genes *CAP* (*CAP59*, *CAP60*, *CAP10*, *CAP64*), quando analisados por interrupção gênica, mostraram-se essenciais, enfatizando a importância da cápsula como um fator de virulência em *C. neoformans* (Chang & Kwon-Chung, 1994; Chang *et al.*, 1996; Chang & Kwon-Chung, 1998; Chang & Kwon-Chung, 1999). Um segundo grupo de genes também parece exercer um papel fundamental nesta rota. Os genes *CAS* (*Cas1-Cas6*) estão envolvidos na síntese dos polissacarídeos da cápsula e são associados à virulência (Moyrand *et al.*, 2002).

Em estudos de infecção experimental em camundongos, a composição antigênica da cápsula *in vivo* é distinta em diferentes órgãos infectados, sugerindo uma evolução da estrutura capsular durante a infecção (Charlier *et al.*, 2005). A acetilação também é um importante fator responsável pelas propriedades imunogênicas e de virulência da cápsula (Kozel *et al.*, 2003). Durante a infecção, há um aumento significativo de seu tamanho devido à presença de estímulos, tais como altos níveis de CO₂ e limitação de ferro. Sabe-se que o desenvolvimento da cápsula no processo de infecção ocorre por crescimento apical, e que durante o brotamento, forma de reprodução assexuada da levedura, há a formação de

rearranjos na estrutura capsular. A elucidação dos mecanismos utilizados para o desenvolvimento da cápsula em *C. neoformans* é essencial, uma vez que este processo é associado à virulência (Zaragoza *et al.*, 2006).

1.2.2 Síntese de melanina

A produção de melanina contribui para a virulência de *C. neoformans* protegendo a levedura contra os mecanismos do sistema de defesa do hospedeiro. Melaninas são pigmentos hidrofóbicos carregados negativamente, formados pela oxidação de compostos fenólicos e/ou indólicos. O fungo capta precursores dopaminérgicos do ambiente extracelular e, por ação da enzima lacase (fenoloxidase) associada à membrana, sintetiza melanina, com sua consequente deposição entre a membrana e a parede celular (Casadevall & Perfect, 1998; Zhu *et al.*, 2001). No ambiente, a melanização é um mecanismo de proteção contra predadores, como por exemplo, as amebas (Steenbergen *et al.*, 2001), ou contra radiação UV (Casadevall & Perfect, 1998). Durante a infecção, a produção de melanina inibe a resposta imune do hospedeiro, protege as células fúngicas contra antioxidantes, e contra a ação de macrófagos (Zhu & Williamson, 2004). A síntese de melanina em *C. neoformans* utiliza substratos exógenos, tais como dopamina, epinefrina, e norepinefrina. O tropismo da levedura pelo sistema nervoso central pode-se justificar pela presença destes compostos em altas concentrações. Áreas do cérebro ricas nestes neurotransmissores são frequentemente colonizadas durante a infecção (Casadevall & Perfect, 1998).

A enzima lacase, responsável pela síntese de melanina em *C. neoformans*, é codificada pelo gene *LAC1*, e exerce acentuado impacto na virulência deste microrganismo.

Linhagens mutantes para este gene (*lac1Δ*) foram analisadas em modelos de infecção experimental, e mostraram-se menos virulentas quando comparadas a linhagens selvagens (Salas *et al.*, 1996). Recentemente, uma segunda lacase, codificada pelo gene *LAC2*, foi descrita em *C. neoformans*. Sabe-se que esta enzima também participa da biossíntese de melanina, porém seu nível de transcrição basal é significativamente menor em relação à transcrição de *LAC1* (Zhu & Williamson, 2004). Vias de sinalização ativadas por AMPc controlam a produção de melanina, bem como a síntese da cápsula polissacarídica. A análise da disrupção de genes que codificam componentes conservados desta rota, como proteína Gα, adenililciclase, e a proteína kinase A, demonstrou que não há aumento da produção de cápsula e de melanina em resposta a condições normais de indução (Pukkila-Worley *et al.*, 2005).

1.2.3 Desenvolvimento a 37°C

Microrganismos patogênicos devem estar aptos a sobreviver na temperatura fisiológica do hospedeiro para que ocorra a proliferação e manutenção da infecção por eles ocasionada. A habilidade de desenvolvimento a 37°C é uma característica fundamental de fungos patogênicos humanos. A capacidade de desenvolvimento a temperaturas mais altas do que 42°C é um fator de virulência estabelecido para linhagens patogênicas de *Saccharomyces cerevisiae* (McCusker *et al.*, 1994). Desenvolvimento a 37°C está associado com a transição da forma micelial para leveduriforme, a qual é essencial para a virulência de patógenos humanos dimórficos, tais como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatidis* e *Paracoccidioides brasiliensis* (Kraus *et al.*, 2004). Dentre as 38 espécies do

gênero *Cryptococcus*, *C. neoformans* e *C. gattii* são as únicas capazes de estabelecer desenvolvimento normal acima de 30°C (Perfect, 2006). A tolerância a temperaturas elevadas pode variar entre linhagens e variedades de *C. neoformans*. Linhagens de *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) geralmente são mais tolerantes, quando comparadas a linhagens de *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) (Martinez *et al.*, 2001).

Estudos moleculares identificaram uma variedade de genes associados ao desenvolvimento a 37°C em *C. neoformans* (Perfect, 2005). O gene *CNA1* codifica a proteína calcineurina, uma fosfatase serina/treonina específica, a qual é necessária para resposta ao estresse e integridade celular em leveduras (Odom *et al.*, 1997). A calcineurina é formada por um heterodímero composto por uma subunidade catalítica A, e uma subunidade regulatória B (*CNBI*) (Fox *et al.*, 2001). A associação destas duas subunidades é necessária, porém não essencial, para obtenção da calcineurina funcional. A ativação ocorre quando complexos Ca⁺²/calmodulina ligam-se a um domínio localizado na região regulatória C-terminal da subunidade A, desencadeando mudanças conformacionais e exposição do sítio ativo da enzima (Kraus *et al.*, 2005). Mutantes nulos para calcineurina não são viáveis a 37°C, e não são patogênicos quando analisados por infecção em modelo experimental (Odom *et al.*, 1997). Calcineurina e MPK1 promovem remodelamento da parede celular em condições de estresse em resposta a temperaturas elevadas. O gene *MPK1* codifica uma MAP kinase de *C. neoformans*, enzima envolvida em manutenção da integridade celular (Kraus *et al.*, 2003).

Com o intuito de caracterizar componentes de rotas de sinalização reguladas por calcineurina, o gene *CTS1* (*calcineurin temperature suppressor*) foi identificado, o qual codifica uma proteína que possui um domínio de ligação a fosfolipídios e um motivo zíper de leucina. A disrupção desse gene por recombinação homóloga resultou em sensibilidade a

temperatura, defeito da separação celular e posicionamento do septo, inibição do desenvolvimento de hifas, e virulência atenuada da linhagem mutante de *C. neoformans* (Fox *et al.*, 2003).

Buscando identificar genes diferencialmente expressos por *C. neoformans* a 37°C, uma análise por microarranjo identificou o fator de transcrição *MGA2*, envolvido na biossíntese de ácidos graxos. A expressão de genes envolvidos em processos de remodelamento de membrana parece ser essencial para a adaptação a temperaturas elevadas (Kraus *et al.*, 2004).

As proteínas RAS possuem a habilidade de hidrolisar GTP, e estão envolvidas na regulação de diversos processos, como ciclo celular e diferenciação. Em *C. neoformans*, RAS1 regula o estabelecimento da forma filamentosa, *mating* e desenvolvimento a alta temperatura, e mutantes *ras1Δ* são avirulentos em experimentos de infecção em coelhos (Alspaugh *et al.*, 2000). O gene *VPH1* (ATPase vacuolar) foi identificado em uma busca por mutantes defectivos na produção de melanina, e parece regular, além da produção deste pigmento, a produção da cápsula polissacarídica, e a habilidade de desenvolvimento a 37°C. A acidificação vesicular, resultado da ação do produto deste gene possui papel importante em processos de transporte celular, secreção e glicosilação de proteínas (Erickson *et al.*, 2001).

As defesas antioxidantes de *C. neoformans* exercem forte influência na habilidade de desenvolvimento a 37°C. O produto do gene *SOD2* (Mn⁺² – superóxido dismutase) atua como uma proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro dependentes de oxigênio (Giles *et al.*, 2005). Análises do proteoma de cultivo de *C. neoformans* a 37°C identificaram uma tiol peroxidase (TSA1), envolvida em resistência a óxido nítrico e

peróxido. Peroxidases atuam na defesa contra danos oxidativos, e mutantes *tsa1Δ* são significativamente menos virulentos (Missall *et al.*, 2004). Macrófagos, células do sistema imune do hospedeiro, produzem óxido nítrico em resposta à infecção por *C. neoformans* (Gross *et al.*, 1999), e genes envolvidos na resposta a este estresse são essenciais para a manutenção da infecção (Missall *et al.*, 2006). A correlação entre resistência a estresse oxidativo *in vitro* e potencial de virulência de algumas linhagens de *C. neoformans* tem sido alvo de investigação (Akhter *et al.*, 2003; Cox *et al.*, 2003; Wormley *et al.*, 2005).

O gene *STE20*, homólogo aos genes da família PAK (*p21-activated protein kinases*), está localizado no locus *MAT*, e atua em rotas de diferenciação e virulência. A disrupção deste gene em linhagens de *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) evidenciou a participação de *STE20* na adaptação a temperaturas elevadas (Wang *et al.*, 2002). O gene *CCNI* de *C. neoformans*, homólogo ao gene *CFL1* de *S. cerevisiae*, o qual é requerido para replicação de DNA e processamento de RNA, também está envolvido neste processo (Chung *et al.*, 2003). Genes relacionados a biossíntese de aminoácidos são necessários para sobrevivência de *C. neoformans* a 37°C. O gene *SPE3-LYS9* (espermidina sintase-sacaropina desidrogenase) está envolvido na rota biossintética de lisina (Kingsbury *et al.*, 2004a). O gene *ILV2* (acetolactato sintase) atua em rotas de biossíntese de isoleucina e valina, e mutantes *ivl2Δ* rapidamente perdem a viabilidade a 37°C, e são avirulentos em modelos de infecção experimental (Kingsbury *et al.*, 2004b).

Os genes regulados pela temperatura já identificados em *C. neoformans* atuam em uma variedade de processos biológicos, e são apenas uma fração de alvos potenciais para inibição do desenvolvimento desta levedura no hospedeiro (Perfect, 2005). As terapias utilizadas atualmente para o tratamento da criptococose são inadequadas, devido à alta

toxicidade e ação fungistática. Promissores alvos para nova geração de agentes antifúngicos incluem proteínas que são essenciais para desenvolvimento no hospedeiro (Missall *et al.*, 2004).

Análises gênicas identificaram outros fatores que têm sido associados com virulência em *C. neoformans*, incluindo a produção de urease (Cox *et al.*, 2000), secreção de fosfolipases (Cox *et al.*, 2001) e produção de manitol (Chaturvedi *et al.*, 1996).

1.3 O genoma de *Cryptococcus neoformans*

O seqüenciamento do genoma de duas linhagens de *C. neoformans* var. *neoformans* (B3501-A e JEC21) está completo (Loftus *et al.*, 2005). Projetos de seqüenciamento em fase de finalização incluem a análise de uma linhagem de *C. neoformans* var. *grubii* (H99), de um linhagem clínica (R265) e de uma linhagem ambiental (WM276) de *C. gattii* (Idnurm *et al.*, 2005).

A seqüência nucleotídica de 14 cromossomos, compreendendo um total de 20 Mb de DNA, foi determinada para duas linhagens do sorotipo D de *C. neoformans* relacionadas, sendo um passo importante na elucidação do processo de virulência desta levedura patogênica em nível genômico (Loftus *et al.*, 2005). A linhagem B3501-A é termotolerante e possui virulência mais acentuada, quando comparada com JEC21 em modelos de infecção experimental. Aproximadamente 50% da seqüência do genoma de ambas é idêntica, ao passo que os 50% restantes contêm pequenos polimorfismos. A anotação gênica baseou-se no seqüenciamento de 23.000 clones de uma biblioteca normalizada de cDNAs, construída com RNA do fungo cultivado em 14 diferentes condições de desenvolvimento. Foram descritos 6.572 genes, os quais contêm uma média

de 6,3 éxons de 255 pb e 5,3 íntrons de 67 pb. Uma surpreendente quantidade de eventos de *splicing* alternativo e transcritos antisense foram identificados, sugerindo a atuação de ambos como mecanismos regulatórios em *C. neoformans*. Formas alternativas de *splicing* foram preditas para 277 genes, ou 4,2% do transcriptoma, e transcritos antisense foram identificados para 53 genes. A frequência destes transcritos antisense, bem como a presença de componentes moleculares necessários para interferência de RNA já identificados previamente (Gorlach *et al.*, 2002), indicam que a interferência por RNA dupla fita é provavelmente um mecanismo regulatório amplamente utilizado por *C. neoformans* (Loftus *et al.*, 2005).

Transposons representam aproximadamente 5% do genoma de *Cryptococcus*, estando a grande maioria agrupada em blocos em cada cromossomo. Cada bloco é único, porém todos contêm pelo menos uma cópia dos transposons Tcn5 e Tcn6, os quais podem representar regiões centroméricas. Embora a quantidade de transposons no genoma seja alta, eventos de transposição são raros (Idnurm *et al.*, 2005).

Os filos *Basidiomycota* e *Ascomycota* divergiram consideravelmente, tendo compartilhado um ancestral comum há aproximadamente 900 milhões de anos (Hedges *et al.*, 2004). No total, 65% dos genes de *C. neoformans* possuem seqüências homólogas conservadas entre genomas de outros fungos, e destas, 12% são restritas ao genoma do fungo basidiomicético *Phanerochaete chrysosporium*. Outros 10% parecem ser seqüências únicas de *C. neoformans*, baseado na ausência de homólogos descritos em bancos de dados públicos, ao passo que as 25% restantes não são similares a seqüências descritas em fungos (Loftus *et al.*, 2005). Duas das 11 famílias gênicas que parecem ser únicas de *C. neoformans* estão envolvidas na formação de cápsula, e as restantes codificam proteínas relacionadas à formação da parede celular. Aproximadamente 60% dos genes de *C.*

neoformans podem ser classificados de acordo com funções moleculares baseados no *Gene Ontology (GO annotation)*. Comparações com o perfil exibido por *S. cerevisiae* revelaram uma distribuição similar de genes agrupados em distintas categorias funcionais (Loftus *et al.*, 2005). Em contraste com *S. cerevisiae*, entretanto, o genoma de *C. neoformans* apresenta genes ricos em íntrons e um transcriptoma caracterizado por eventos de *splicing* alternativo. Estes dados, aliados a informações do genoma de *P. chrysosporium* (Martinez *et al.*, 2004), sugerem que estruturas gênicas mais complexas compõem o genoma de fungos pertencentes ao filo *Basidiomycota*. A disponibilidade do seqüenciamento completo do genoma de *C. neoformans* auxilia na elucidação de diferenças nas estratégias de virulência entre esta levedura e outros fungos patogênicos, bem como na identificação e caracterização de genes envolvidos na patogenicidade (Loftus *et al.*, 2005).

1.4 Estratégias para identificação de genes essenciais na virulência de *Cryptococcus neoformans*

Uma série de ferramentas para estudos de genômica funcional está disponível, possibilitando a identificação e caracterização de genes relacionados com patogenicidade em *C. neoformans*. Este microrganismo é um excelente modelo para avaliação da virulência em fungos patogênicos humanos. *C. neoformans* desenvolve-se como uma levedura haplóide, e pode ser facilmente transformado, facilitando a disrupção gênica por recombinação homóloga (Perfect, 2005). Sistemas de transformação mediados por eletroporação (Edman *et al.*, 1990), bombardeamento (Toffaletti *et al.*, 1993), ou por *Agrobacterium tumefaciens* (McClelland *et al.*, 2005), e a utilização de marcas de seleção

dominante (McDade *et al.*, 2001) ou complementação auxotrófica (Edman *et al.*, 1990) para seleção dos transformantes estão bem estabelecidos. A eficiência de recombinação homóloga varia de acordo com o método de transformação e a linhagem que será transformada (Perfect *et al.*, 2005). Estratégias envolvendo interferência de RNA (Liu *et al.*, 2002) e repressão antisenso (Gorlach *et al.*, 2002) também estão sendo aplicadas em *C. neoformans* com o intuito de identificar genes essenciais. Além disso, modelos de infecção experimental para estudos de virulência foram estabelecidos em camundongos, coelhos, cultura de células de macrófagos *in vitro*, e, mais recentemente, em hospedeiros ambientais, incluindo *Acanthamoeba castellanii*, *Caenorhabditis elegans*, *Dictyostelium discoideum*, *Drosophila melanogaster*, e *Galleria mellonella* (Idnurm *et al.*, 2004; London *et al.*, 2006).

Análises por mutagênese insercional e deleção gênica têm sido adaptadas e desenvolvidas como ferramentas eficientes para investigação da função de genes em fungos (Weld *et al.*, 2006). Experimentos de mutagênese insercional mediada por *A. tumefaciens* permitem a integração aleatória da região de T-DNA no genoma de *C. neoformans*, e conseqüente identificação de novos componentes relacionados a fatores de virulência clássicos da levedura (Idnurm *et al.*, 2004; Walton *et al.*, 2005). Os mutantes gerados são analisados quanto à produção de cápsula, melanina, e habilidade de desenvolvimento a 37°C. Transformantes defectivos em algum destes fatores são selecionados, com o intuito de identificar em que região do genoma ocorreu a integração do T-DNA. Estes estudos possibilitaram a descoberta de cinco genes adicionais envolvidos em melanização, os quais codificam uma proteína de transporte de cobre (CCC2), uma chaperona (ATX1), uma quitina sintase (CHS3), um co-ativador transcricional (MBF1), e uma enzima remodeladora de cromatina (SNF5) (Walton *et al.*, 2005).

Avaliações do perfil de transcrição global de *C. neoformans* em condições controladas são úteis para a identificação de produtos gênicos atuantes em processos de virulência. Análise seriada da expressão gênica (SAGE) foi utilizada para identificar genes transcritos preferencialmente em condições de temperatura elevada e de infecção em modelo experimental (Steen *et al.*, 2002; Steen *et al.*, 2003). Genes relacionados a estresse por choque térmico e maquinaria de tradução parecem estar envolvidos com desenvolvimento a 37°C (Steen *et al.*, 2002). Além disso, transcritos associados à síntese protéica, degradação de proteínas, resposta ao estresse, e transporte de moléculas são expressos diferencialmente em condições de infecção (Steen *et al.*, 2003). Genes regulados pela temperatura em *C. neoformans* foram identificados em experimentos de microarranjo. A expressão do fator de transcrição MGA2, responsável pela ativação de genes da rota biossintética de ácidos graxos, é induzida a 37°C (Kraus *et al.*, 2004).

A análise da diferença representacional (RDA) é baseada em sucessivos ciclos de hibridização subtrativa, seguidos de amplificação por PCR, o que possibilita o enriquecimento e isolamento de seqüências de mRNA com expressão diferencial em determinada condição (Pastorian *et al.*, 2000). A metodologia de RDA foi originalmente projetada para identificar diferenças entre duas populações genômicas, permitindo o isolamento de seqüências presentes exclusivamente em um determinado genoma (Lisitsyn *et al.*, 1993). Esta ferramenta tem sido amplamente utilizada em estudos de câncer (Hollestelle & Schutte, 2005), e em análises de expressão em uma série de organismos, tais como plantas (Ling *et al.*, 2003), insetos (Judice *et al.*, 2006), cestódeos (Bizarro *et al.*, 2005), bactérias (Choi *et al.*, 2002), e fungos (Dutra *et al.*, 2004; Myazaki *et al.*, 2005).

As distintas estratégias, as quais têm sido desenvolvidas com o intuito de identificar genes essenciais, permitem a caracterização de diferentes genes envolvidos em um mesmo

processo. Em *C. neoformans*, a elucidação da ação de determinados produtos gênicos em rotas relacionadas à habilidade de desenvolvimento na temperatura do corpo humano é fundamental para o estudo de possíveis alvos para o desenvolvimento de drogas e vacinas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abegg, M. A.; Cella, F. L.; Faganello, J.; Valente, P.; Schrank, A.; Vainstein, M. H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia*, 161:83-91, 2006.
- Ackter, S.; McDade, H. C.; Gorlach, J.M.; Heinrich, G.; Cox, G. M.; Perfect, J. R. Role of alternative oxidase in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 71: 5794-5802, 2003.
- Alsbaugh, J. A.; Cavallo, L. M.; Perfect, J. R.; Heitman, J. RAS1 regulates filamentation, mating, and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, 36: 352-365, 2000.
- Bizarro, C. V.; Bengtson, M. H.; Ricachenevsky, F. K.; Zaha, A.; Sogayar, M. C.; Ferreira, H. B. Differentially expressed sequences from a cestode parasite reveals conserved developmental genes in platyhelminthes. *Mol Biochem Parasitol*, 144: 114-118, 2005.
- Bose, I.; Reese, A. J.; Ory, J. J.; Janbon, G.; Doering, T. L. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 2:655-63, 2003.
- Callejas, A.; Ordonez, N.; Rodriguez, M. C.; Castaneda, E. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. *Med Mycol*, 36:341-44, 1998.
- Casadevall, A.; Perfect, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washington: American Society for Microbiology Press, 1998.

- Casali, A. K.; Goulart, L.; Rosa e Silva, L. K.; Ribeiro, A. M.; Amaral, A. A.; Alves, S. H.; Schrank, A.; Meyer, W.; Vainsten, M. H. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Res*, 3: 405-415, 2003.
- Chang, Y. C.; Kwon-Chung, K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol*, 14:4912-4919, 1994.
- Chang, Y. C.; Penoyer, L. A.; Kwon-Chung, K. J. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. *Infect Immun*, 64: 1977-1983, 1996.
- Chang, Y. C.; Kwon-Chung, K. J. Isolation of the third capsule-associated gene, CAP60, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 66:2230-2236, 1998.
- Chang, Y. C.; Kwon-Chung, K. J. Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol*, 181: 5636-5643, 1999.
- Charlier, C.; Chretien, F.; Baudrimont, M.; Mordelet, E.; Lortholary, O.; Dromer, F. Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. *Am J Pathol*, 166: 421-432, 2005.
- Chaturvedi, V.; Flynn, T.; Niehaus, W. G.; Wong, B. Stress tolerance and pathogenic potential of a mannitol mutant of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 142:937-943, 1996.
- Choi, J. Y.; Sifri, C. D.; Goumnerov, B. C.; Rahme, L. G.; Ausubel, F. M.; Calderwood, S. B. Identification of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational difference analysis. *J Bacteriol*, 184: 952-961, 2002.

- Chung, S.; Mondon, P.; Chang, Y. C.; Kwon-Chung, K. J. *Cryptococcus neoformans* with a mutation in the tetra tricopeptide repeat-containing gene, CCN1, causes subcutaneous lesions but fail to cause systemic infection. *Infect Immun*, 71: 1988-1994, 2003.
- Cox, G. M.; Mukherjee, J.; Cole, G. T.; Casadevall, A.; Perfect, J. R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun*, 68: 443-448, 2000.
- Cox, G. M.; McDade, H. C.; Chen, S. C.; Tucker, S. C.; Gottfredsson, M.; Wright, L. C.; Sorrell, T. C.; Leidich, S. D.; Casadevall, A.; Ghannoum, M. A.; Perfect, J. R. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, 39: 166-175, 2001.
- Cox, G. M.; Harrison, T.S.; McDade, H. C.; Taborda, C. P.; Heinrich, G.; Casadevall, A.; Perfect, J. R. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect Immun* 71: 173-180, 2003.
- Del Valle, L.; Pina-Oviedo, S. HIV disorders of the brain: pathology and pathogenesis. *Front Biosci*, 11:718–32, 2006.
- Doering, T. L. How does *Cryptococcus* get its coat? *Trends Microbiol*, 8:547-553, 2000.
- Dutra, V.; Nakazato, L.; Broetto, L.; Schrank, I. S.; Vainstein, M. H.; Schrank, A. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. *Res Microbiol* 155: 245-251, 2004.
- Edman, J. C.; Kwon-Chung, K. J. Isolation of the URA5 gene from *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and its use as a selective marker for transformation. *Mol Cell Biol*, 10:4538-4544, 1990.

- Ellis, L.; Marriotti, D.; Hajjeh, R. A.; Warnock, D.; Meyer, W.; Barton, R. Epidemiology: surveillance of fungal infections. *Med Mycol*, 1: 173-182, 2000.
- Erickson, T.; Liu, L.; Gueyikian, A.; Zhu, X.; Gibbons, J.; Williamson, P. R. Multiple virulence factors of *Cryptococcus neoformans* are dependent on *VPH1*. *Mol Microbiol*, 42: 1121-1131, 2001.
- Fox, D. S.; Cruz, M. C.; Sia, R. A.; Ke, H.; Cox, G. M.; Cardenas, M. E.; Heitman, J. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, 39:835-49, 2001.
- Fox, D. S.; Cox, D. M.; Heitman, J. The phospholipid-binding protein Cst1 controls septation and functions coordinately with calcineurin in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 2: 1025-1035, 2003.
- Franzot, S. P.; Salkin, I. F.; Casadevall, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol*, 37:838-40, 1999.
- Fraser, J.A.; Giles, S. S.; Wenink, E. C.; Geunes-Boyer, S. G.; Wright, J. R.; Diezmann, S.; Allen, A.; Stajich, J. E.; Dietrich, F. S.; Perfect, J. R.; Heitman, J. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature*, 437: 1360-1364, 2005.
- Giles, S. S.; Batinic-Haberle, I.; Perfect, J. R.; Cox, G. M. *Cryptococcus neoformans* mitochondrial superoxide dismutase: an essential link between antioxidant function and high-temperature growth. *Eukaryot Cell*, 4: 46-54, 2005.
- Gorlach, J. M.; McDade, H. C.; Perfect, J. R.; Cox, G. M.; Antisense repression in *Cryptococcus neoformans* as a laboratory tool and potential antifungal strategy. *Microbiology*, 148: 213-219, 2002.

- Gross, N. T., Nessa, K.; Camner, P.; Jarstrand, C. Production of nitric oxide by rat alveolar macrophages stimulated by *Cryptococcus neoformans* or *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol*, 37: 151-157, 1999.
- Hollestelle, A.; Schutte, M. Representational difference analysis as a tool in the search for new tumor suppressor genes. *Methods Mol Med*, 103: 143-159, 2005.
- Horta, J. A.; Staats, C. C.; Casali, A. K.; Ribeiro, A. M.; Schrank, I. S.; Schrank, A.; Vainstein, M. H. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian State Rio Grande do Sul. *Med Mycol*, 40: 1-7, 2002.
- Idnurm, I.; Bahn, Y.; Nielsen, K.; Xiaorong, L.; Fraser, J. A.; Heitman, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nature Rev Microbiol* 3: 753-764, 2005.
- Judice, C. C.; Carazzole, M. F.; Festa, F.; Sogayar, M. C.; Hartfelder, K.; Pereira, G. A.; Gene expression profiles underlying alternative caste phenotypes in a highly eusocial bee, *Melipona quadrifasciata*. *Insect Mol Biol* 15: 33-44, 2006.
- Kidd, S. E.; Hagen, F.; Tschärke, R. L.; Huynh, M.; Bartlett, K. H.; Fyfe, M.; Macdougall, L.; Boeckhout, T.; Kwon-Chung, K. J.; Meyer, W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 17258-17263, 2004.
- Kingsbury, J. M.; Yang, Z.; Ganous, T. M.; Cox, G. M.; McCusker, J. H. Novel chimeric spermidine synthase-saccharopine dehydrogenase gene (SPE3-LYS9) in the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 3: 752-763, 2004a.

- Kingsbury, J. M.; Yang, Z.; Ganous, T. M.; Cox, G. M.; McCusker, J. H. *Cryptococcus neoformans* Ilv2p confers resistance to sulfometuron methyl and is required for survival at 37 degrees C and in vivo. *Microbiology*, 150:1547-1558, 2004b.
- Kozel, T. R.; Levitz, S. M.; Dromer, F.; Gates, M. A.; Thorkildson, P.; Janbon, G. Antigenic and biological characteristics of mutant strains of *Cryptococcus neoformans* lacking capsular O acetylation or xylosyl side chains. *Infect Immun*, 71:2868-2875, 2003.
- Kraus, P. R.; Fox, D. S.; Cox, G. M.; Heitman, J. The *Cryptococcus neoformans* MAP Kinase homolog Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. *Mol Microbiol*, 48: 1377-1387, 2003.
- Kraus, P. R.; Boily, M.; Giles, S. S., Stajich, J. E.; Allen, A.; Cox, G. M.; Fred, S. D.; Perfect, J. R.; Heitman, J. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a Genomic-DNA microarray. *Eucaryot Cell*, 3: 1249-1260, 2004.
- Kraus, P. R.; Nichols, C. B.; Heitman, J. Calcium and calcineurin independent roles for calmodulin in *Cryptococcus neoformans* morphogenesis and high temperature growth. *Eucaryot Cell*, 4: 1079-1087, 2005.
- Kwon-Chung, K. J. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia*, 68: 943-46, 1976.
- Kwon-Chung, K. J.; Edman, J. C.; Wickes, B. L. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 60:602-5, 1992.
- Kwon-Chung, K. J.; Boekhout, T.; Fell, J. W.; Diaz, M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon* 51: 804-806, 2002.

- Lengeler, K. B.; Fox, D. S.; Fraser, J. A.; Allen, A.; Forrester, K.; Dietrich, F. R.; Heitman, J. Mating-type locus of *Cryptococcus neoformans*: a step in the evolution of sex chromosomes. *Eukaryot Cell*, 1:704-718, 2002.
- Lin, X.; Hull, C. M.; Heitman, J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. *Nature*, 434:1017–21, 2005.
- Lin, X.; Heitman, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Annu Rev Microbiol*, in press, 2006.
- Ling, J. Q.; Kojima, T.; Shiraiwa, M.; Takahara, H. Cloning of two cysteine proteinase genes, CysP1 and CysP2, from soybean cotyledons by cDNA representational difference analysis. *Biochim Biophys Acta* 1627: 129-139, 2003.
- Lisitsyn, N.; Lisitsyn, N.; Wigler, M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259: 946-951, 1993.
- Liu, H.; Cottrell, T. R.; Pierini, L. M.; Goldman, W. E.; Doering, T. L.; RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* 160:463-470, 2002.
- Loftus, B. J.; Fung, E.; Roncaglia, P.; Rowley, D.; Amedeo, P.; Bruno, D.; Vamathevan, J.; Miranda, M.; Anderson, I. J.; Fraser, J. A.; Allen, J. E.; Bosdet, I. E.; Brent, M. R.; Chiu, R.; Doering, T. L.; Donlin, M. J.; D'Souza, C. A.; Fox, D. S.; Grinberg, V.; Fu, J.; Fukushima, M.; Haas, B. J.; Huang, J. C.; Janbon, G.; Jones, S. J.; Koo, H. L.; Krzywinski, M. I.; Kwon-Chung, J. K.; Lengeler, K. B.; Maiti, R.; Marra, M. A.; Marra, R. E.; Mathewson, C. A.; Mitchell, T. G.; Pertea, M.; Riggs, F. R.; Salzberg, S. L.; Schein, J. E.; Shvartsbeyn, A.; Shin, H.; Shumway, M.; Specht, C. A.; Suh, B. B.; Tenney, A.; Utterback, T. R.; Wickes, B. L.; Wortman, J. R.; Wye, N. H.; Kronstad, J. W.; Lodge, J. K.; Heitman, J.; Davis, R. W.; Fraser, C. M.; Hyman, R. W.) The genome of the basidiomycetous yeast human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*, 307: 1321-1324, 2005.

- London, R.; Orozco, B. S.; Mylonakis, E. The pursuit of cryptococcal pathogenesis: heterologous hosts and the study of cryptococcal host-pathogen interactions. *FEMS Yeast Res*, 6: 567-573, 2006.
- Martinez, L. R.; Garcia-Rivera, J.; Casadevall, A. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains. *J Clin Microbiol*, 39: 3365-3367, 2001.
- McClelland, C. M.; Chang, Y. C.; Kwon-Chung, K. J. High frequency transformation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Fungal Genet Biol*, 42: 904-913, 2005.
- McCusker, J. H.; Clemons, K. V.; Stevens, D. A.; Davis, R. W. Genetic characterization of pathogenic *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Genetics*, 136: 1261-1269, 1994.
- McDade, H. C.; Cox, G. M. A new dominant selectable marker for use in *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol*, 39: 151-159, 2001.
- Missall, T. A.; Pusateri, M. E.; Lodge, J. K. Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, 51: 1447-1458, 2004.
- Missall, T. A.; Pusateri, M. E.; Donlin, M. J.; Chambers, K. T.; Corbett, J. A.; Lodge, J. K. Posttranslational, translational, and transcriptional responses to nitric oxide stress in *Cryptococcus neoformans*: implications for virulence. *Eukaryot Cell*, 5: 518-529, 2006.
- Mitchell, T. G.; Perfect, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS—100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev*, 8: 515-48, 1995.

- Miyazaki, Y.; Nakamura, M.; Babasaki, K. Molecular cloning of developmentally specific genes by representational difference analysis during the fruiting body formation in the basidiomycete *Lentinula edodes*. *Fungal Genet Biol*, 42: 493-505, 2005.
- Monari, C.; Bistoni, F.; Vecchiarelli, A. Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties. *FEMS Yeast Res*, 6: 537-542, 2006.
- Moyrand, F.; Klapproth, B.; Himmelreich, U.; Dromer, F.; Janbon, G. Isolation and characterization of capsule structure mutant strains of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, 45: 837-849, 2002.
- Nielsen, K.; Cox, G. M.; Wang, P.; Toffaletti, D. L.; Perfect, J. R.; Heitman, J. Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and virulence of congenic α and α isolates. *Infect Immun*, 71: 4831-4841, 2003.
- Odom, A., Muir, S.; Lim, E.; Toffaletti, D. L.; Perfect, J. R.; Heitman, J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J*, 16: 2576-2589, 1997.
- Pastorian, K.; Hawel, L.; Byus, C. V. Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Anal Biochem*, 283: 89-98, 2000.
- Perfect, J. R. *Cryptococcus neoformans*: A sugar-coated killer with designer genes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 45: 395-404, 2005.
- Perfect, J. R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. *FEMS Yeast Res* 6: 463-468, 2006.
- Pfeiffer, T. J.; Ellis, D. H. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. *J Med Vet Mycol*, 30: 407-8, 1992.

- Pukkila-Worley, R.; Gerrald, Q. D.; Kraus, P. R.; Boily, M. J.; Davis, M. J.; Giles, S. S.; Cox, G. M.; Heitman, J.; Alspaugh, J. A. Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. *Eukaryot Cell*, 4: 190-201, 2005.
- Salas, S. D.; Bennett, J. E.; Kwon-Chung, K. J.; Perfect, J. R.; Williamson, P. R. Effect of the laccase gene, CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med*, 184: 377-386, 1996.
- Sanguinetti, M.; Posteraro, B.; La Sorda, M.; Torelli, R.; Fiori, B.; Santangelo, R.; Delogu, G.; Fadda, G. Role of AFR1, an ABC transporter-encoding gene, in the in vivo response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 74: 1352-1359, 2006.
- Sorrell, T. C.; Chen, S. C.; Ruma, P.; Meyer, W.; Pfeiffer, T. J.; Ellis, D. H.; Brownlee, A. G.; Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. *J Clin Microbiol*, 34: 1253-60, 1996.
- Sorrell, T. C. *Cryptococcus neoformans* var *gattii*. *Med Mycol* 39: 155-168, 2001.
- Steen, B. R.; Lian, T.; Zuyderduyn, S.; MacDonald, W. K.; Marra, M.; Jones, S. J.; Konstrad, J. W. Temperature-regulated transcription in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genome Res* 12: 1386-1400, 2002.
- Steen, B. R.; Zuyderduyn, S.; Toffaletti, D. L.; Marra, M.; Jones, S. J.; Perfect, J. R.; Konstrad, J. *Cryptococcus neoformans* gene expression during experimental cryptococcal meningitis. *Eukaryot Cell* 2: 1336-1349, 2003.

- Steenbergen, J. N.; Shuman, H. A.; Casadevall, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 15245–50, 2001.
- Toffaletti, D. L.; Rude, T. H.; Johnston, S. A.; Durack, D. T.; Perfect, J. R. Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *J Bacteriol*, 175: 1405-1411, 1993.
- Tscharke, R. L.; Lazera, M.; Chang, Y. C.; Wickes, B. L.; Kwon-Chung, K. J. Haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans* is not mating type alpha-specific. *Fungal Genet Biol*, 39: 230–37, 2003.
- Walton, F. J.; Idnurm, A.; Heitman, J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, 57: 1381-1396, 2005.
- Wang, P.; Nichols, C. B.; Lengeler, K. B.; Cardenas, M. E.; Cox, G. M.; Perfect, J. R.; Heitman, J. Mating-type-specific and nonspecific PAK kinases play shared and divergent roles in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 1: 257-272, 2002.
- Weld, R. J.; Plummer, K. M.; Carpenter, M. A.; Ridgway, H. J. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Research*, 16: 31-44, 2006.
- Wormley, F. L. Jr; Heinrich, G.; Miller, J. L.; Perfect, J. R.; Cox, G. M. Identification and characterization of an SKN7 homologue in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 73: 5022-5030, 2005.
- Zaragoza, O.; Telzak, A.; Bryan, R. A.; Dadachova, E.; Casadevall, A. The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding. *Mol Microbiol*, 59: 67-83, 2006.

Zhu, X.; Gibbons, J.; Garcia-Rivera, J.; Casadevall, A.; Williamson, P. R. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infect Immun*, 69: 5589-5596, 2001.

Zhu, X.; Williamson, P. R. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res*, 5: 1-10, 2004.