João Daniel Santos Fernandes

Avaliação dos genes *TRP3* e *TRP5* da via de biossíntese do triptofano no patógeno oportunista *C. neoformans* quanto a sua aplicabilidade como alvo de drogas antifúngicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2014

João Daniel Santos Fernandes

Avaliação dos genes *TRP3* e *TRP5* da via de biossíntese do triptofano no patógeno oportunista *C. neoformans* quanto a sua aplicabilidade como alvo de drogas antifúngicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Renata Castiglioni Pascon

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Fernandes, João Daniel Santos.

Avaliação dos genes TRP3 e TRP5 da via de biossíntese do triptofano no patógeno oportunista *C. neoformans* quanto a sua aplicabilidade como alvo de drogas antifúngicas / João Daniel Santos Fernandes. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Renata Castiglioni Pascon.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Genética e biologia molecular de fungos.

Versão do título para o inglês: Evaluation of TRP3 and TRP5 tryptophan biosynthetic pathway genes in the opportunistic pathogen *Cryptococcus neoformans* and its applicability as a target for antifungal drugs.

1. Antimicóticos 2. *Cryptococcus neoformans* 3. Inibidores de enzimas 4. Micologia 5. Microbiologia médica I. Pascon, Profa. Dra. Renata Castiglioni II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0195/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): João Daniel Santos Fernandes.

Título da Dissertação: Avaliação dos genes TRP3 e TRP5 da via de biossíntese do triptofano no patógeno oportunista *C. neoformans* quanto a sua aplicabilidade como alvo de drogas antifúngicas.

Orientador(a): Profa. Dra. Renata Castiglioni Pascon.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos por este trabalho vão primeiramente aos meus pais e irmãos que sempre me apoiaram em tudo, permitindo que eu fizesse minhas próprias escolhas, me aconselhando e tentando ajudar em tudo que podiam para reduzir minhas dificuldades.

Agradeço também aos meus amigos e colegas que me ajudaram a superar os diversos problemas que enfrentei durante esses anos de trabalho e que também compartilharam comigo os momentos de vitória ou apenas por tornar diversos momentos mais agradáveis dentro e fora do laboratório.

Um dos principais agradecimentos tem de ser dado a minha orientadora, Renata Pascon, não teria encarado esse mestrado e não teria saído melhor do que entrei se não fosse por ela, e quaisquer elogios ao meu trabalho são resultado das suas orientações e correções. Aproveito e agradeço também ao professor Marcelo Vallim, que, como sempre falei, agiu como se fosse meu co-orientador, sem oficialmente ter este papel. E agradeço também aos professores Cristina Viana-Niero, Júlio César de Oliveira e Joel Machado Jr. por todo apoio e orientação oferecidos nesses anos todos.

Agradecimentos especiais à pesquisadora Tamara Doering, que gentilmente nos forneceu a ferramenta com a qual obtivemos o principal resultado neste trabalho.

RESUMO

FERNANDES, J. D. S. **Avaliação dos genes *TRP3* e *TRP5* da via de biossíntese do triptofano no patógeno oportunista *C. neoformans* quanto a sua aplicabilidade como alvo de drogas antifúngicas.** 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A Criptococose é uma doença oportunista causada pelo fungo *C. neoformans* que têm aumentado nos últimos anos, tornando-se um grave problema devido à escassez de antifúngicos no mercado, principalmente por causa da baixa ocorrência de alvos. As vias de biossíntese de aminoácidos são alvos atraentes para os antifúngicos, pois teriam alta toxicidade seletiva. Em *C. neoformans* a rota de biossíntese do triptofano é única, não está presente em mamíferos e, dependendo da relevância que tem na sobrevivência e na virulência deste patógeno, poderá ser considerada como um bom alvo de drogas para o desenvolvimento de novos antifúngicos. Partindo desta premissa, o objetivo deste trabalho foi interromper a via de síntese do triptofano em dois pontos diferentes e avaliar qual impacto isso tem na sobrevivência do patógeno. A estratégia foi deletar os genes *TRP3* e *TRP5*, os quais codificam enzimas envolvidas no primeiro e no último passo da via. Após inúmeros ciclos de transformação e seleção não foi possível recuperar nenhum mutante com o fenótipo auxotrófico esperado, sugerindo que as mutações são letais. A inativação condicional de *TRP3* e *TRP5* pela técnica de RNA de interferência comprovou que a biossíntese do triptofano é essencial em *C. neoformans*. Este resultado valida o uso desta via como alvo para o desenvolvimento de novos antifúngicos e suscita uma questão importante: a essencialidade da via reflete a ineficiência de *C. neoformans* em transportar aminoácidos para o meio intracelular? Para responder à esta pergunta foi realizado um levantamento das permeases de aminoácidos codificadas pelo genoma de *C. neoformans*. Os resultados de bioinformática demonstraram que este fungo possui 8 loci (*AAP1* a *AAP8*) que codificam sequências de aminoácidos com alta similaridade às 24 permeases de *S. cerevisiae* classificadas como APC. O padrão de expressão destas 8 permeases em resposta às diferentes condições nutricionais foi avaliado por PCR em tempo real. O resultado mostrou que somente 6 são, de fato, expressas nas condições aqui testadas, todas têm expressão induzida em meio pobre e destas, *AAP2*, *AAP4*, *AAP5* e *AAP8* parecem ser induzidas pela presença de aminoácidos. O mecanismo de repressão catabólica por nitrogênio parece atuar sobre 3 permeases (*AAP2*, *AAP5* e *AAP8*). Em suma, este trabalho demonstrou que a via de síntese de triptofano em *C. neoformans* é um excelente alvo de novos antifúngicos e ofereceu uma possível explicação para a essencialidade da via de biossíntese do triptofano em *C. neoformans*, além de indicar o 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON) e o N-(3-indolilacetil)-DL-ácido aspártico como possíveis inibidores desta via.

Palavras-chave: Antimicóticos. *Cryptococcus neoformans*. Inibidores de enzimas. Micologia. Microbiologia médica.

ABSTRACT

FERNANDES, J. D. S. **Evaluation of *TRP3* and *TRP5* tryptophan biosynthetic pathway genes in the opportunistic pathogen *Cryptococcus neoformans* and its applicability as a target for antifungal drugs.** 2014. 88 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Cryptococcosis is an opportunistic infection caused by the yeast *C. neoformans* that have increased in recent years, becoming a serious problem due to shortage of antifungals on the market, since not many targets are available. The amino acids biosynthetic pathways are attractive targets for antifungals, because they would have high selective toxicity. In *C. neoformans* the route of tryptophan biosynthesis is unique, is not present in mammals and, depending on the relevance which has on the survival and virulence of this pathogen, this may be considered a good target for drug development of new antifungal agents. Therefore, the aim of this study was to interrupt the tryptophan biosynthetic pathway at the first and last step by deleting *TRP3* and *TRP5* genes and evaluating the consequences on mutant survival. After several cycles of transformation and selection, no tryptophan auxotrophic mutant could be selected, suggesting the mutations are lethal. The conditional inactivation of *TRP3* and *TRP5* with the technique of RNA interference showed that tryptophan biosynthesis is essential in *C. neoformans*. This result validates the use of this pathway as a target for the development of new antifungal drugs and raises an important question: Does the essentiality of the pathway reflect the inefficiency of *C. neoformans* in amino acids uptake? To answer this question a search for amino acid permeases encoded by the *C. neoformans* genome was performed. The bioinformatics results showed that this yeast has 8 loci (*AAP1* to *AAP8*) encoding amino acid sequences with high similarity to 24 permeases of *S. cerevisiae* classified as APC. The expression pattern of these 8 permeases in response to different nutritional conditions was evaluated by real time PCR. The result showed that only 6 of them are expressed in the conditions tested in this work and all of them have increased expression in response to poor medium. *AAP2*, *AAP4*, *AAP5* and *AAP8* seems to be regulated by the presence of amino acids in the extracellular environment and 3 of them (*AAP2*, *AAP5* and *AAP8*) seem to be regulated by the nitrogen catabolism repression. In summary, this study demonstrated that the of tryptophan biosynthetic pathway in *C. neoformans* is an excellent target for new antifungals drugs and offered a possible explanation for the essentiality of the pathway in *C. neoformans*. Also, this work indicates that 6-diazo -5-oxo-L-norleucine (DON) and N- (3-indolilacetil) -DL-aspartic acid (IAAA) are putative inhibitors of this pathway.

Keywords: Antimycotics. *Cryptococcus neoformans*. Enzyme inhibitors. Mycology. Medical microbiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo de RNA de interferência para <i>C. neoformans</i>	23
Figura 2 - Simplificação das vias de biossíntese de aminoácidos interligadas entre si e com as vias de biossíntese de nucleotídeos a partir de glutamato e glutamina, sintetizados a partir de amônia.....	26
Figura 3 - A via de biossíntese do triptofano contendo cinco passos bioquímicos controlados por quatro genes em <i>C. neoformans</i>	31
Figura 4 - Ação dos antimetabólitos ácido 5-Fluoroantranílico (5-FAA), ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA) e ácido 5-metilantranílico (5-MAA) em <i>C. neoformans</i> em meio rico YEPD e meio sintético YNB à 30 °C por 72 horas.....	53
Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose mostrando a construção de $\Delta trp3::Hph^R$ por PCR de sobreposição.....	55
Figura 6 - RNAi para o gene <i>TRP3</i>	58
Figura 7 - RNAi para o gene <i>TRP5</i>	58
Figura 8 - RNAi para os genes <i>TRP3</i> (<i>Trp3i</i>) e <i>TRP5</i> (<i>Trp5i</i>) e para CNU026.....	60
Figura 9 - O gráfico mostra a expressão relativa de 6 possíveis permeases encontradas no genoma de <i>C. neoformans</i> e avaliadas quanto ao padrão de expressão por PCR em tempo real.....	63
Figura 10 – O gráfico mostra a expressão relativa das permeases <i>AAP1</i> e <i>AAP2</i> encontradas no genoma de <i>C. neoformans</i> por PCR em tempo real. As proporções são relativas ao meio complexo (YEPD).....	63
Figura 11 - O gráfico mostra a expressão relativa das permeases <i>AAP2</i> , 4, 5 e 8 encontradas no genoma de <i>C. neoformans</i> por PCR em tempo real.....	64
Figura 12 – O gráfico mostra a expressão relativa dos 4 genes da via de biossíntese do triptofano por PCR em tempo real.....	65
Figura 13 - Teste de crescimento com diluição seriada das linhagens de <i>C. neoformans</i> (sorotipo sorotipos A e D) e <i>C. gattii</i> (sorotipos B e C) inoculadas em placas com YEPD contendo 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON) em diferentes concentrações.....	66
Figura 14 - Teste de crescimento com diluição seriada das linhagens de <i>C. neoformans</i> (sorotipo sorotipos A e D) e <i>C. gattii</i> (sorotipos B e C) inoculadas em placas com YEPD contendo N-(3-indolilacetil)-DL-ácido aspártico (IAAA) em diferentes concentrações.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Disposição dos genes da via de biossíntese de triptofano em <i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i> e <i>C. neoformans</i>	29
Tabela 2 - Lista dos microrganismos utilizados neste trabalho.....	34
Tabela 3 - Lista de plasmídeos utilizados neste trabalho.....	34
Tabela 4 - Meios de cultivo indutores e repressores do silenciamento gênico pós-transcricional por RNAi.....	47
Tabela 5 - Organização genômica dos genes da via de biossíntese do triptofano em <i>C. neoformans</i> sorotipos A e D.....	51
Tabela 6 - Transformantes recuperados na biolística por meio de seleção e gene deletado.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Permease de aminoácido
AS COII	Antranilato sintase componente II
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	DNA complementar
CdRP	1-(o-carboxifenilamino) 1-desoxiribulose 5-fosfato
DEPC	Dicarbonato de dietila
DON	6-Diazo-5-oxo-L-norleucina
dsRNA	RNA de dupla fita
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetraacético
GAAC	Controle geral de aminoácidos
GATase	Glutamina amidotransferase
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFI	Infecção fúngica invasiva
IGP	Indol glicerol fosfato
5-FAA	Ácido 5-fluoroantranílico
5-FOA	Ácido 5-fluoroorótico
IAA	N-(3-indolilacetil)-DL-alanina
IAAA	N-(3-indolilacetil)-DL-ácido aspártico
IAV	N-(3-indolilacetil)-DL-valina
IGPS	Indol glicerol fosfato sintase
LB	Luria-Bertani
MRD	Marca de resistência a droga
NCBI	Nacional Center for Biotechnology Information
NCR	Repressão catabólica de nitrogênio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRAI	Fosforibosil-antranilato isomerase
RdRP	RNA polimerase dependente de RNA
RNAi	RNA de interferência
siRNA	Pequeno RNA de interferência
TE	Tris-EDTA

Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
TS	Triptofano sintase
YEPD	Extrato de levedura-peptona-dextrose
YEPG	Extrato de levedura-peptona-galactose
YNB	Base de nitrogênio de levedura

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
g	Grama
L	Litro
μ	Micro
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
η	Nano
ηM	Nanomolar
pb	Pares de bases
Kb	Kilo bases
R	Resistência
ATM	Atmosfera
rpm	Rotações por minuto
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Justificativa	17
1.2 Objetivos	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Antifúngicos	18
2.2 <i>Cryptococcus neoformans</i>	19
2.2.1 <i>Biologia do fungo</i>	19
2.2.2 <i>Fatores de virulência</i>	20
2.2.3 <i>C. neoformans como modelo de estudo</i>	22
2.3 Biossíntese e assimilação de aminoácidos em leveduras	24
2.3.1 <i>A via de biossíntese do triptofano e seus inibidores</i>	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Linhagens de microrganismos e plasmídeos	34
3.2 Oligonucleotídeos	35
3.3 Meios de cultura e soluções	35
3.3.1 <i>LB</i>	35
3.3.2 <i>YEPD</i>	35
3.3.3 <i>YEPD com 1M de Sorbitol</i>	36
3.3.4 <i>YEPG</i>	36
3.3.5 <i>YNB com sulfato de amônia e D-Glicose ou D-Galactose</i>	36
3.3.6 <i>YNB adicionado de Prolina e D-Glicose ou D-Galactose</i>	37
3.3.7 <i>Solução estoque de aminoácidos (200X concentrada)</i>	37
3.3.8 <i>Solução de ácido 5-fluoroantranílico (5-FAA)</i>	38
3.3.9 <i>Solução de ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA)</i>	38
3.3.10 <i>Solução de ácido 5-metilantranílico (5-MAA)</i>	38
3.3.11 <i>Solução de ácido 5-fluoroorótico (5-FOA)</i>	38
3.3.12 <i>Solução de 6-Diazo-5-oxo-L-norleucina (DON)</i>	38
3.3.13 <i>Solução de N-(3-indolilacetil)-DL-ácido aspártico (IAAA)</i>	39
3.3.14 <i>Solução de N-(3-indolilacetil)-DL-alanina (IAA)</i>	39
3.3.15 <i>Solução de N-(3-indolilacetil)-DL-valina (IAV)</i>	39
3.3.16 <i>Solução estoque de triptofano</i>	39
3.3.17 <i>Solução estoque para tampão de corrida de eletroforese (TAE 50X concentrada)</i>	40
3.3.18 <i>Gel de agarose 0,8%</i>	40

3.3.19 Solução estoque de brometo de etídeo (10 mg/mL)	40
3.3.20 Tampão da amostra para eletroforese (6x concentrado)	40
3.3.21 Solução de Higromicina	41
3.3.22 Solução de Geneticina (G418)	41
3.3.23 Solução de Ampicilina	41
3.3.24 Tampão TENTS de extração de DNA de levedura	41
3.3.25 Tris-EDTA (TE)	41
3.3.26 Solução de RNase	42
3.4 Extração de DNA Plasmidial	42
3.5 Extração de DNA Genômico	42
3.6 Deleção da região codificadora dos genes da via de síntese de triptofano	42
3.7 Clonagem e transformação de <i>E. coli</i>	44
3.8 Transformação de <i>C. neoformans</i> por biolística (Toffaletti et al., 1993)	44
3.9 Análise de auxotrofia	45
3.10 PCR padrão e diagnóstico	45
3.11 Silenciamento gênico pós-transcricional por RNAi	46
3.12 Indução do silenciamento gênico pós-transcricional por RNAi	47
3.13 Avaliação do crescimento por diluição seriada	47
3.14 Extração Total de RNA	48
3.15 Síntese de cDNA	48
3.16 PCR em tempo real	49
3.17 Testes Estatísticos	49
3.18 Testes com Inibidores	50
4 RESULTADOS	51
4.1 Identificação e caracterização dos genes <i>TRP3</i> e <i>TRP5</i> in silico	51
4.2 Ação dos antimetabólicos na via de biossíntese do triptofano	52
4.3 Inativação dos genes <i>TRP3</i> e <i>TRP5</i> em <i>C. neoformans</i> sorotipo A	54
4.4 Interferência gênica por RNAi	56
4.4.1 Silenciamento dos genes <i>TRP3</i> e <i>TRP5</i>	56
4.4.2 Efeito da temperatura e da fonte de nitrogênio na assimilação de triptofano durante o silenciamento de <i>TRP3</i> e <i>TRP5</i>	59
4.5 Expressão de permeases carreadoras de aminoácidos e dos genes da via de biossíntese do triptofano	60
4.6 Inibidores da via de síntese de triptofano	65
5 DISCUSSÃO	68

6 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS	73
APÊNDICES	85
APÊNDICE A - Lista de oligonucleotídeos usados neste trabalho	85
APÊNDICE B - Permeases presentes em <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	87

1 INTRODUÇÃO

O aumento na população imunocomprometida mundial devido aos transplantes de órgãos, quimioterapia antitumoral e imunossupressão causada por HIV tem impulsionado a pesquisa por novos antimicrobianos. No que se refere aos antifúngicos, a busca por novas formas de tratamento é um grande desafio, devido à baixa toxicidade seletiva dos fármacos, enfatizando a importância da pesquisa de alvos moleculares (BROWN; MADHANI, 2012; LI; MODY, 2010; PARK et al., 2009; PAIVA; PEREIRA, 2013; POUND et al., 2011).

Dentre as Infecções Fúngicas Invasivas (IFIs) a Criptococose é de grande importância devido à alta mortalidade. Estima-se uma quantidade total de um milhão de casos por ano pelo mundo, resultando em 620 mil mortes, principalmente em regiões de alta taxa de pacientes portadores de HIV, como a África sub-saariana (PARK et al., 2009). Esta IFI é causada pelo patógeno oportunista *Cryptococcus neoformans*, sendo uma doença que evolui principalmente em meningite, que é a infecção fúngica disseminada no sistema nervoso central, muito comum em pacientes portadores de HIV (LIU; PERLIN; XUE, 2012). A porta de entrada da criptococose é pela inalação de esporos ou propágulos encontrados principalmente nas excretas de pombos (LIN; HEITMAN, 2006). Por este motivo os pulmões são considerados como o local da infecção primária. Os macrófagos alveolares são responsáveis pela fagocitose das leveduras, as quais são capazes de sobreviver no ambiente intracelular. Nas primeiras horas da infecção a proporção de leveduras intracelulares é maior do que as extracelulares, mas esta relação se inverte até 24 horas após a infecção (FELDMESSER; TUCKER; CASADEVALL, 2001). No indivíduo imunocompetente esta infecção pode ser circunscrita, no entanto, na ausência de um sistema imune atuante, há disseminação da doença para os sistemas circulatório e nervoso central (LIU; PERLIN; XUE, 2012).

Apesar dos avanços em relação aos estudos deste patógeno ainda há grande dificuldade no seu tratamento, a mortalidade desses pacientes é alta, sendo de 10 a 25%, mesmo com o uso de antifúngicos, que são escassos, havendo ainda grande demanda por novas formas de tratamento (LI; MODY, 2010). Além disso, em um terço dos casos de meningite causada por *C. neoformans* ocorrem falhas na terapêutica devido ao surgimento de resistência e inconstância de tratamento (BROWN; MADHANI, 2012; PAIVA; PEREIRA, 2013; POUND et al., 2011).

Além da grande importância clínica, *C. neoformans* é um patógeno oportunista de grande maleabilidade genética, sendo possível realizar estudos aprofundados sobre a sua biologia, as bases

genéticas da expressão dos diversos fatores de virulência envolvidos na patogênese e as interações patógeno-hospedeiro (ALSPAUGH, 2014; HEITMAN, 2011). A necessidade de novos tratamentos aliada a esta capacidade investigativa coloca *C. neoformans* como um modelo biológico de estudos de central importância para a validação de alvos moleculares e desenvolvimento de novos fármacos. Em decorrência do estágio avançado de estudos em *C. neoformans*, sabe-se que a sobrevivência e, eventualmente a expressão de fatores de virulência no hospedeiro, depende da capacidade do patógeno enfrentar e responder *in vivo* aos diversos tipos de estresses, como por exemplo: térmico, osmótico, oxidativo e nutricional (FAN et al., 2005). No que tange a este último, são conhecidos mecanismos regulatórios que permitem reconhecer os nutrientes disponíveis no ambiente e reprogramar a atividade metabólica de forma que a síntese, assimilação ou a reciclagem de nutrientes venham a garantir a melhor adaptabilidade e balanço energético. Genes relacionados ao transporte e assimilação de açúcares, ferro, amônia, fosfato, cobre, vitaminas e aminoácidos são induzidos em *C. neoformans* quando o mesmo encontra-se nas células fagocíticas (FAN et al., 2005; HU et al., 2008). Muitos destes genes já foram correlacionados diretamente a capacidade de causar doença em modelo animal de infecção (KRONSTAD et al., 2011). Os aspectos metabólicos mais estudados referem-se aos mecanismos de assimilação de carbono, nitrogênio, ferro, cobre e fosfato (DING et al., 2011; KMETZSCH et al., 2011; KRETSCHMER et al., 2014; KRONSTAD; HU; JUNG, 2013; LEE et al., 2011; LIU et al., 2008).

Os processos que regulam a síntese, assimilação e reciclagem de aminoácidos não são conhecidos em *C. neoformans*, como em *S. cerevisiae* (LJUNGDAHL; DAIGNAN-FORNIER, 2012). Porém, diversas vias de biossíntese de aminoácidos têm sido exploradas como potenciais alvos de novos antifúngicos. Pelo menos 20 aminoácidos são sintetizados *de novo* em microrganismos, plantas, e parasitas apicomplexos, destas vias de biossíntese, nove estão presentes em animais, incluindo o homem, representando, portanto potenciais alvos moleculares de alta toxicidade seletiva (GUEDES et al., 2011).

Em *C. neoformans* as vias de biossíntese da lisina, isoleucina, valina, treonina e metionina já foram descritas e a deleção de inúmeros genes leva à atenuação da virulência (KINGSBURY; MCCUSKER, 2008, 2010a, b, c; PASCON et al., 2004; YANG et al., 2002). Especialmente, a via de síntese da treonina é essencial em *C. neoformans* (KINGSBURY; MCCUSKER, 2008), o que a coloca como um excelente alvo de drogas.

Neste sentido a via de biossíntese dos aminoácidos aromáticos ainda não foi estudada em *C. neoformans*, porém, sabe-se que o glifosato, que é um inibidor da síntese dos aminoácidos aromáticos, inibe a melanização *in vitro* e prolonga a sobrevivência de camundongo infectados com *C. neoformans* (NOSANCHUK; OVALLE; CASADEVALL, 2001), sendo, portanto, este grupo de aminoácidos alvos promissores de drogas. Ao contrário da tirosina e da fenilalanina, o triptofano possui somente uma rota de síntese, sendo esta de grande interesse como alvo para desenvolvimento de novos antifúngicos, uma vez que esta via não está presente no ser humano e qualquer alvo que a afete terá uma alta toxicidade seletiva sobre o patógeno (BRAUS, 1991; HÜTTER; NIEDERBERGER; DEMOSS, 1986).

1.1 Justificativa

Atualmente existe uma necessidade constante de novos antimicrobianos devido ao surgimento de patógenos emergentes e do desenvolvimento de resistência microbiana (HOLE; WORMLEY JR., 2012; POWDERLY, 1993; SAAG et al., 2000; VAN DER HORST et al., 1997). Com relação aos antifúngicos o problema é ainda maior, devido ao pequeno número de alvos moleculares disponíveis para desenvolvimento de novos fármacos. As vias de biossíntese de aminoácidos são atraentes para os estudos de validação de alvos moleculares porque são essenciais para os microrganismos e frequentemente estão ausentes nos eucariotos superiores, marcadamente nas células animais. As vias de biossíntese dos aminoácidos aromáticos, já foram largamente usadas como alvos do herbicida glifosato em plantas. Dois genes que codificam enzimas específicas da via de síntese de triptofano, *TRP3* e *TRP5*, nunca foram estudados em *C. neoformans*. Além disso, estes alvos não foram validados e não há registros na literatura sobre o impacto que a falta destes genes trará sobre a sobrevivência, os fatores de virulência e a patogenicidade deste fungo oportunista e, portanto sobre a sua utilidade como alvo molecular de novos antifúngicos.

1.2 Objetivos

Este projeto tem como objetivo validar a via de biossíntese do triptofano como alvo de novas drogas antifúngicas e avaliar a eficácia de inibidores específicos desta via sobre o crescimento de *C. neoformans*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antifúngicos

As principais infecções fúngicas invasivas são causadas por organismos dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*, para as quais sempre houve grande escassez de antifúngicos funcionais no mercado. Uma das razões para isso é a dificuldade de se encontrar bons alvos para ação de drogas devido à semelhança das células fúngicas e animais, ambas eucariotas e o uso contínuo acaba por selecionar organismos resistentes aos medicamentos, esses fatos somados justificam a constante busca por novos antifúngicos (ANDES et al., 2013; OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010).

As quatro principais classes de antifúngicos são os polienos, azóis, inibidores de síntese de ácidos nucleicos e equinocandinas. Os polienos como a anfotericina B e os azóis como o fluconazol atuam de formas diferentes sobre o ergosterol que é um análogo do colesterol e componente estrutural da membrana plasmática. Os polienos se ligam ao ergosterol causando a abertura de poros na membrana levando a perda de conteúdo celular, enquanto que os azóis inibem a síntese do ergosterol, levando a má formação da membrana. Os agentes que causam o bloqueio da síntese dos ácidos nucleicos, como a 5-Fluorocitosina impedem a replicação e a classe das equinocandinas tem como alvo a síntese das glucanas que são componentes da parede celular dos fungos (ANDES, 2013; OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010; POUND et al., 2011; WEERDEN; BLEACKLEY; ANDERSON, 2013).

As vias de biossíntese de aminoácidos e vitaminas podem representar uma boa alternativa para a descoberta de novos alvos para drogas antifúngicas. Esta estratégia já foi testada em plantas, como é o caso do glifosato que bloqueia a síntese dos aminoácidos aromáticos e é comercializado com o nome de Roundup (LAROSSA; SCHLOSS, 1984). Vários outros exemplos podem ser encontrados na literatura (KISHORE; SHAH, 1988; YAMAKI et al., 1992). O uso destas vias justifica-se, uma vez que várias destas estão presentes em microrganismos e plantas, mas ausentes nos animais, aumentando assim a toxicidade seletiva da droga.

2.2 *Cryptococcus neoformans*

2.2.1 *Biologia do fungo*

Até 1949 a espécie *C. neoformans* era considerada homogênea, sendo possível reconhecer quatro sorotipos ou quatro variedades: *C. neoformans* var. *grubii* sorotipo A, *C. neoformans* var. *gattii* sorotipo B, *C. neoformans* var. *gattii* sorotipo C e *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo D (EVANS, 1950; FRANZOT; SALKIN; CASADEVALL, 1999; KWON-CHUNG, 1975). Atualmente considera-se que a meningite fúngica é causada por duas espécies: *C. neoformans* var. *grubii* sorotipo A e var. *neoformans* sorotipo D e a espécie *C. gattii* sorotipos B e C (LIU; PERLIN; XUE, 2012; MEYER et al., 2009). Inúmeras técnicas de tipagem molecular são empregadas para separar estas espécies e seus sorotipos, como por exemplo: PCR-RFLP, RAPD, PCR e “Multi-Locus Sequences Typing” (MLST) (SIDRIM et al., 2010). Com isso é possível avaliar a diversidade genética, tanto interespecífica, quanto intraespecífica, presente no complexo de espécies *C. neoformans* e *C. gattii* (MEYER et al., 2009). A principal diferença entre as duas espécies é do ponto de vista patológico, sendo que a espécie *C. neoformans* causa doença apenas em pacientes imunodeficientes e *C. gattii* também afeta indivíduos imunocompetentes (DUNCAN et al., 2006; LIAO et al., 2013; QAZZAFI et al., 2007; WILBUR; HEYBORNE, 2009). Além desta diferença, *C. neoformans* e *C. gattii* também ocupam nichos ecológicos e tem distribuição geográfica distinta, sendo que a primeira espécie está mais associada à excreta de pombos e tem dispensação global e a segunda está associada à madeira em decomposição, principalmente eucalipto, com distribuição principalmente em áreas tropicais e subtropicais, como Austrália, Papua Guiné, e mais recentemente no Canadá (LIN; HEITMAN, 2006).

C. neoformans é um fungo Basidiomiceto dimórfico que apresenta uma fase leveduriforme e uma filamentosa, foi isolado pela primeira vez em 1894 de amostras de suco de pêssego (LIU; PERLIN; XUE, 2012) e foi descrito pela primeira vez em sua var. *neoformans* por Kwon-Chung (1976), recebendo o nome de *Filobasidiella neoformans*. Na fase leveduriforme, este fungo é heterotático, isto é, possui dois tipos sexuais haplóides: a e α (KWON-CHUNG; BENNETT, 1978; NIELSEN et al., 2003). A descoberta do ciclo sexual em *C. neoformans* abriu a possibilidade de se realizar inúmeros experimentos de genética neste microrganismo. Além disso, Kwon-Chung, Edman e Wickes (1992) demonstraram que o tipo sexual α é mais virulento que o a no modelo animal, o que foi confirmado pelos estudos de Lengeler et al. (2002) no qual o tipo sexual α está

relacionado à maior virulência e ocorrência, sendo 40 e 30 vezes mais frequente nos isolados naturais e isolados clínicos, respectivamente.

São conhecidas três vias de transdução de sinal que regulam o ciclo sexual (mating), uma que é desencadeada por ferormônios, ativando uma MAPKinase, uma segunda provocada por deficiência nutricional e mediada por cAMP-PKA e uma via de transdução de sinal mediada pela proteína RAS cuja função, acredita-se, é a de fazer a comunicação entre as duas primeiras vias servindo como um sinalizador comum entre elas (ALSPAUGH; PERFECT; HEITMAN, 1997, 2000; WANG; HEITMAN, 1999). Além desta função, estas vias também são responsáveis por controlar importantes fatores de virulência como a formação da cápsula polissacarídica, produção de melanina e o crescimento a 37 °C (LENGELER et al., 2002; LI; MODY 2010; ROMAN et al., 2007; VALLIM et al., 2005).

A infecção por *Cryptococcus sp.* ocorre inicialmente pela inalação dos esporos ou propágulos presentes no meio externo, solo e madeira, principalmente, alojando-se nos pulmões do animal infectado, podendo causar sintomas quase imperceptíveis em indivíduos imunocompetentes (BOTTS; HULL, 2010; LIU; PERLIN; XUE, 2012). Infecções no sistema circulatório tendem a ocorrer com a imunodeficiência de pacientes que já possuíam a infecção nos pulmões, dessa forma, quando ocorre essa deficiência, há uma reativação desses propágulos ou esporos nos pulmões que passam para o sistema circulatório, onde se acreditam que haja um tropismo pelo sistema nervoso central, o patógeno então tende a atravessar a barreira hemato-encefálica, instalando-se ali e causando meningite fúngica (HULL; HEITMAN, 2002; LIN; HEITMAN, 2006; LIU; PERLIN; XUE, 2012). O tratamento dessa doença depende muito da severidade da infecção e o órgão afetado e as doses dos medicamentos, além desses fatores, podem depender também de condições especiais do paciente, como idade, gravidez, etc, mas de forma geral, quando o paciente possui infecção leve nos pulmões ou mesmo assintomática, este é tratado normalmente com o antifúngico fluconazol e quando a infecção é mais grave ou está presente no sistema nervoso central, o tratamento normalmente é feito, inicialmente, com anfotericina B e flucitocina e posteriormente com fluconazol por um longo período (PERFECT et al., 2010).

2.2.2 Fatores de virulência

A capacidade de invadir, sobreviver e causar doença de *C. neoformans* é dependente da expressão de uma série de fatores de virulência como: a capacidade de crescer a temperatura

fisiológica dos mamíferos (37 °C), ou seja, a termotolerância, produção de cápsula polissacarídica, produção de melanina, fosfolipase B, protease, urease e a capacidade de realizar alternância fenotípica o que promove a formação de colônias gelatinosas, as quais têm maior permanência nos tecidos do sistema nervoso central, causando doença (GUERRERO; FRIES, 2008). *C. gattii* também faz alternância fenotípica, sendo capaz de invadir agressivamente o sistema nervoso central. O mecanismo pelo qual a alternância fenotípica aumenta a patogenicidade, tanto em *C. neoformans* quanto em *C. gattii* ainda não é conhecido (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009).

O crescimento a 37 °C, além de ser influenciado pelas vias de transdução de sinal também é controlado por uma fosfatase dependente de Cálcio (calcineurina) (HEMENWAY; HEITMAN, 1999). Além de controlar o crescimento a 37 °C, esta proteína é importante para o crescimento e virulência, conforme mostram os experimentos em modelo animal para meningite (CRUZ; FOX; HEITMAN, 2001; ODOM et al., 1997). Além do estresse térmico, *C. neoformans* também é capaz de resistir a estresse oxidativo através da ação de diversas peroxidases (BROWN; CAMPBELL; LODGE, 2007; UPADHYA et al., 2013), e a produção de manitol, pela ação da enzima manitol desidrogenase, ajuda a resistir aos estresses osmótico, oxidativo e térmico principalmente no sistema nervoso central onde ocorre a maior produção de manitol (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009).

A formação de cápsula polissacarídica é considerada o fator de virulência mais importante em *C. neoformans*, ela protege a levedura no ambiente contra dessecação e contra predadores naturais como amebas e nematoides. No hospedeiro, sua defesa atua de diversas formas, como na diminuição da resposta de citocinas inflamatórias, na inibição da capacidade de apresentação de antígenos de monócitos e diversas outras respostas imunes que são melhores descritas no trabalho de Kavanagh (2007). A cápsula também ajuda a proteger a levedura contra fagocitose por macrófagos, mas mesmo quando a fagocitose não é impedida, a cápsula atua dificultando a ativação de células dendríticas, processamento do antígeno e, conseqüentemente, a resposta imune (O'MEARA; ALSPAUGH, 2012).

A melanização também é considerada um importante fator de virulência, pois a melanina tem propriedade oxido-redutora, sendo capaz de inativar antibióticos e os efeitos dos metais pesados sobre a célula fúngica. A enzima lacase faz parte da via de síntese da melanina e, portanto também é considerado um fator de virulência (DOERING, 2009; NOSANCHUK;

CASADEVALL, 2003). Sua expressão é quase que exclusivamente encontrada no cérebro (WATERMAN et al., 2007).

A fosfolipase B1 é uma enzima multifuncional em *C. neoformans* envolvida na aderência e à infecção do epitélio pulmonar, sobrevivência e replicação no interior do macrófago (COX et al., 2001; GANENDREN et al., 2006).

A urease, apesar de ainda não se saber exatamente como ela atua na virulência, esta é atenuada na ausência dessa enzima no hospedeiro, e, portanto, também é considerada um fator de virulência desse organismo. Sabe-se que essa enzima atua na quebra da ureia em amônia e gás carbônico para utilizar a amônia como fonte de nitrogênio alterando o pH do ambiente em que se encontra (COX et al., 2000; SINGH et al., 2013).

2.2.3 *C. neoformans* como modelo de estudo

C. neoformans possui um sistema genético maleável, isto é, possui ciclo sexual, faz filamentação haploide em resposta à condição nutricional, possui pelo menos uma fase haplóide no seu ciclo de vida cujo crescimento é bastante rápido. Aliado a estas características genéticas, este fungo tem grande relevância clínica, o que tem impulsionado o estudo das inter-relações patógeno-hospedeiro e virulência. (ALSPAUGH; PERFECT; HEITMAN, 1998; ALSPAUGH; DAVIDSON; HEITMAN, 2000; FOX; HEITMAN, 2002; JANBON, 2004; LI; MODY, 2010; LIU; PERLIN; XUE, 2012; LOFTUS et al., 2005; PERFECT; CASADEVALL, 2002; WANG; HEITMAN, 1999). O resultado disso é que *C. neoformans* hoje pode ser considerado um modelo de estudo em micologia médica, graças ao desenvolvimento de ferramentas sofisticadas de biologia molecular, como a introdução de moléculas de DNA recombinante produzidas *in vitro* em linhagens laboratoriais e clínicas. Toffaletti et al. (1993) observaram que a eletroporação é a técnica mais eficiente para transformação de DNA recombinante em Sorotipo D, não produzindo transformantes em Sorotipo A, enquanto que a biolística gera mais de 2500 transformantes/ μ g de DNA, tanto no sorotipo A quanto D, mas a introdução de cDNA por esse mesmo método produziu de 20 a 30 transformantes/ μ g de DNA apenas em Sorotipo A, os quais representam somente eventos de integrações homólogas. Conclui-se então que a biolística é o melhor método para a transformação do sorotipo A quando se deseja produzir eventos de integração homóloga.

Uma alternativa à deleção genética e uma forma de estudar genes essenciais em *C. neoformans* pode ser feita através do silenciamento gênico pós-transcricional desencadeado pelo

RNA de interferência (RNAi). Esse processo é um mecanismo natural encontrado em diversos organismos eucariotos, inclusive fungos, como *C. neoformans* (SKOWYRA; DOERING, 2012), sendo utilizado na regulação gênica e na defesa contra vírus e atividade de transposons. Em biologia molecular esse mecanismo é utilizado para estudar funções gênicas ou mesmo para interromper a expressão, podendo ser assim utilizada em terapias para doenças genéticas ou contra patógenos (DOGINI et al., 2014; SALAME et al., 2011). Em *C. neoformans*, o processo é desencadeado por RNAs de dupla fita (dsRNA) produzidos pela RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) e que são posteriormente clivados pela enzima DICER em pequenos RNAs de interferência dupla fita (siRNA) de 20 a 30 pb (pares de base), como pode ser visto na figura 1. Estes siRNAs são carregados pela proteína Argonauta que compõe a subunidade catalítica do complexo de silenciamento gênico pós-transcricional induzido por RNA (RISC) buscando regiões de homologia em RNAs mensageiros (mRNA), os quais aderem ao complexo e são clivados silenciando a expressão dos genes correspondentes ao dsRNA (BILLMYRE et al., 2013; DANG et al., 2011; LIPARDI; WEI; PATERSON, 2001; SKOWYRA; DOERING, 2012).

Figura 1 - Modelo de RNA de interferência para *C. neoformans*. RNA dupla fita (dsRNA) é clivado pela enzima Dicer em pequenos RNAs de interferência (siRNA) que se ligam ao complexo de silenciamento gênico pós-transcricional induzido por RNA (RISC) e por homologia reconhecem o mRNA alvo e este é clivado, causando a interferência (DYKXHOORN; NOVINA; SHARP, 2003).

Existe outro mecanismo de interferência que foi descrito em 2002 em *C. neoformans*, o silenciamento gênico pós-transcricional induzido pelo ciclo sexual (sex-induced silencing - SIS). Esse mecanismo, descrito por Wang et al. (2010) utiliza a maquinaria do RNA de interferência e sua indução é bastante aumentada durante o ciclo sexual sob privação nutricional, silenciando sequências repetitivas possivelmente para proteger o genoma ao ser duplicado (WANG et al., 2010).

Aproveitando-se da maquinaria de RNAi presente em *C. neoformans*, Skowrya e Doering (2012) desenvolveram ferramentas de biologia molecular como alternativas à deleção gênica, como é o caso do plasmídeo pIBB103. Este plasmídeo pode ativar, de forma condicional, o sistema de RNAi, pois ele possui dois promotores convergentes (Gal7) que flanqueiam o sítio de clonagem e que são induzidos na presença de D-Galactose e reprimidos em D-Glicose, então somente na presença de D-Galactose há a formação de dsRNA que desencadeará o processo de silenciamento gênico pós-transcricional, sendo perfeito para se estudar genes essenciais (WICKES; EDMAN, 1995).

Outras importantes ferramentas para manipulação genética são os marcadores auxotróficos e de resistência a drogas, largamente utilizados, para a seleção dos transformantes (HUA; MEYER; LODGE, 2000; HULL; HEITMAN, 2002; MCDADE; COX, 2001), e inúmeros promotores induzíveis, por exemplo, Gal7 e CTR4 (ORY; GRIFFITH; DOERING, 2004; SKOWYRA; DOERING, 2012). Todas estas ferramentas de genética e biologia molecular é que tornam possível associar metabolismo à virulência e desta forma a busca por melhores tratamentos.

2.3 Biossíntese e assimilação de aminoácidos em leveduras

Sabe-se que *S. cerevisiae*, um dos mais usados modelos de estudo de leveduras e eucariotos de modo geral, possui vias de assimilação e de biossíntese de aminoácidos funcionando em paralelo, as quais são geneticamente reguladas de acordo com a disponibilidade dos nutrientes do meio. Mudanças ambientais podem causar reprogramação em alta escala da expressão gênica dessas vias de modo bastante preciso. Os mecanismos de regulação pós-traducionais complementam o sistema de controle. Ambos permitem ajustes rápidos nas propriedades catalíticas de enzimas, na modulação de taxas de degradação enzimática, na indução da expressão de enzimas e permeases e na regulação do fluxo de metabólitos dentro e fora das organelas (LJUNGDAHL; DAIGNAN-FORNIER, 2012).

S. cerevisiae consegue sintetizar todos os aminoácidos necessários para produzir suas proteínas (Figura 2). Esses processos de síntese estão todos interligados, bem como à produção de nucleotídeos. A amônia é considerada a fonte primária ou preferencial de nitrogênio, a qual pode ser utilizada nas formas de glutamato, produzido pela reação entre amônia e α -cetoglutarato pela ação da glutamato desidrogenase (Gdh1) ou na forma de glutamina, produzida pela ação da glutamina sintetase (Gln1) sobre a amônia e o glutamato. Outros compostos podem ser usados como fonte de nitrogênio para produzir glutamato e glutamina, mas são consideradas fontes não preferenciais de nitrogênio. Independente da fonte de nitrogênio, a partir destes compostos, a levedura consegue produzir todos os demais aminoácidos e ácidos nucleicos necessários. O glutamato é responsável por 85% dessa produção e glutamina 15% a partir de diversas reações, entre elas a dos ciclos de Krebs, glicólise e gliconeogênese como representado na figura 2. Parte da regulação sobre essas vias catabólicas de aminoácidos e ácidos nucleicos é feita pela repressão catabólica de nitrogênio (NCR – Nitrogen Catabolic Repression). Trata-se de um mecanismo genético conhecido desde o começo da década de 1960, no qual a fonte de nitrogênio ativa fatores de transcrição que irão induzir ou reprimir genes relacionados com a síntese ou assimilação de aminoácidos e ácidos nucleicos. A função primordial da regulação por NCR é garantir que a fonte preferencial de nitrogênio (amônia) seja consumida prioritariamente. Para que este objetivo seja alcançado este circuito genético lança mão de uma série de proteínas regulatórias, dentre os quais temos Ure2 e quatro fatores de transcrição do tipo GATA, Gln3, Gat1, Dal80 e Gzf3, os quais promovem a repressão catabólica de genes associados ao uso das fontes não preferenciais. Durante a repressão catabólica predominam as vias de biossíntese de aminoácidos, porém, quando a fonte preferencial é esgotada há alívio da repressão catabólica, permitindo que as células assimilem outras fontes de nitrogênio, como os aminoácidos que servem como fonte de nitrogênio. Isso implica na indução da expressão de permeases (LJUNGDAHL; DAIGNAN-FORNIER, 2012; MAGASANIK; KAISER, 2002). São conhecidas 24 AAPs em *S. cerevisiae* que transportam aminoácidos através da membrana plasmática, todos pertencentes à superfamília de transportadores Aminoácido-Poliamina-Colina (APC), que possuem funções devidamente caracterizadas (WIPF et al., 2002).

As vias de biossíntese e assimilação de aminoácidos também podem ser reguladas por outros dois mecanismos em *S. cerevisiae*. O controle geral de aminoácidos (GAAC – General amino acid control) atua no nível da transcrição, ativando mais de 500 genes envolvidos no

Além dos mecanismos de regulação gênica, há ainda a regulação das atividades enzimáticas. Na biossíntese dos aminoácidos aromáticos, os produtos finais, tirosina e fenilalanina funcionam como inibidores da enzima DAHP Sintase (3-Deoxi-D-Arabinheptulosonato-7-Fosfato Sintase), inibindo genes específicos que codificam essa enzima, impedindo a produção de corismato, que é precursor dos três aminoácidos. O triptofano por sua vez atua como inibidor da enzima antranilato sintase, impedindo a formação de ácido antranílico, precursor do próprio aminoácido e também atua como ativador de corismato mutase, enzima que codifica a reação do corismato em prefenato na via de síntese de tirosina e fenilalanina, enquanto que essa mesma enzima é inibida por tirosina (BRAUS, 1991).

2.3.1 A via de biossíntese do triptofano e seus inibidores

A utilidade das vias de biossíntese de aminoácidos e vitaminas como alvo de novas drogas em leveduras patogênicas começou a ser explorada em *C. neoformans* há cerca de 10 anos. Passos metabólicos importantes para a síntese da lisina, isoleucina e metionina foram estudados em *C. neoformans* como possíveis alvos de novos antifúngicos (KINGSBURY et al., 2004a, b; KINGSBURY; MCCUSKER, 2008, 2010a, b, c; PASCON et al., 2004; YANG et al., 2002).

O uso de genes envolvidos na assimilação de enxofre e na biossíntese da metionina foram especialmente interessantes em *C. neoformans*. A deleção do gene que codifica a ATP sulforilase (*met3*) resultou em um mutante com crescimento reduzido, avirulento no modelo animal de inalação, e uma série de deficiências relacionadas a fatores de virulência (YANG et al., 2002). Ainda dentro da via de biossíntese da metionina, a deleção do gene *met6* (metionina sintase), além de gerar um mutante auxotrófico para metionina, mostrou ser avirulento no modelo animal, produzir baixos níveis de melanina, não forma cápsula, acumula homocisteína, que é um composto tóxico e inibe a síntese de ergosterol, tem crescimento lento em meio suplementado com metionina e baixa viabilidade celular. Além disso, o mutante $\Delta met6$ é hipersensível ao fluconazol, FK506 e a ciclosporina A. Os inibidores de calcineurina apresentam um efeito citocida no mutante *met6*, diferente do fluconazol que tem efeito citostático (PASCON et al., 2004). O interesse por esta via foi tal que a empresa multinacional Bayer CropScience depositou uma patente no USPTO (United States Patent US7955828 B2) para o uso da metionina sintase como alvo de novos antifúngicos de uso agrícola, bem como investe na pesquisa de inibidores desta enzima (DROUX; LEBRUN, 2011).

Os aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofano) são sintetizados *de novo* a partir do corismato; este por sua vez é produzido a partir do fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato na via do ácido chiquímico (HERRMANN, 1995). O triptofano é um aminoácido essencial, sem o qual nenhum organismo consegue sobreviver e se multiplicar. As archeas, as bactéria, os fungos e as plantas são capazes de sintetizar todos os 3 aminoácidos aromáticos, porém, os animais em geral, são capazes de sintetizar somente tirosina por hidroxilação da fenilalanina, sendo dependentes de dieta para adquirir os outros aminoácidos aromáticos. A tirosina e a fenilalanina tem duas rotas alternativas de síntese a partir do corismato, já o triptofano possui somente uma rota, a qual é composta de cinco passos bioquímicos, que são invariáveis entre os eucariotos e procariotos (Figura 3) (HÜTTER; NIEDERBERGER; DEMOSS, 1986).

A biossíntese de triptofano em *C. neoformans* se inicia com a conversão do corismato em antranilato pela ação da antranilato sintase, que é formada por 2 componentes, I e II. Nesta etapa, uma glutamina é deaminada pela ação da antranilato sintase COII (AS COII) e o radical amino é incorporado ao corismato pela ação da antranilato sintase COI (AS COI), formando assim o antranilato. No segundo passo, um radical ribosil é transferido ao antranilato convertendo-o em N-5-Fosforibosil antranilato pela antranilato fosforibosil transferase. Já o terceiro passo é feito pela fosforibosil-antranilato isomerase, que converte o N-5-Fosforibosil antranilato em 1-(o-carboxifenilamino) 1-desoxiribulose 5-fosfato através de um rearranjo irreversível feito em uma reação de oxidoredução. O penúltimo passo da síntese ocorre com a descarboxilação do 1-(o-carboxifenilamino) 1-desoxiribulose 5-fosfato convertendo-se em Indol-3-Glicerol-Fosfato pela ação da indolglicerol fosfato sintase. Por fim, neste último passo, ocorrem duas reações catalisadas pela enzima bifuncional triptofano sintase, que possui duas subunidades, α e β (DETTWILER; KIRSCHNER, 1979; RABONI; BETTATI; MOZZARELLI, 2009), na primeira, há um sítio de reconhecimento de moléculas de indol, seguido de quebra da molécula de Indol-3-glicerol-fosfato em duas outras, indol e gliceraldeído-3-fosfato e, em seguida, a molécula de indol passa através de um túnel interno entre as subunidades da enzima (HUANG; HOLDEN; RAUSHEL, 2001), chegando à subunidade β , condensando-se com uma serina, formando triptofano, como representado na figura 3 (Revisado por BRAUS, 1991).

A disposição no genoma dos genes que codificam as enzimas necessárias para conversão do corismato em triptofano é bastante variável quando comparamos *E. coli*, *S. cerevisiae* e *C. neoformans*, como a ilustra a Tabela 1. Em *E. coli* são necessários sete genes (*TrpA* ao *TrpG*)

organizados em um único operon, em *S. cerevisiae* cinco genes (*TRP1* ao *TRP5*) e em *C. neoformans* 4 genes (CNAG_06679.2, CNAG_04501.2, CNAG_00811.2 e CNAG_00649.2) codificam as sete atividades enzimáticas envolvidas nestes 5 passos bioquímicos que realizam a conversão do corismato em triptofano (Tabela 1). Esta organização é bastante consistente nos eucariotos, os quais em geral apresentam uma organização genômica mais compacta, sendo frequentes diversas versões diferentes de enzimas multifuncionais (HÜTTER; NIEDERBERGER; DEMOSS, 1986). A análise da organização dos genes da via de biossíntese de triptofano em outros basidiomicetos por métodos de bioinformática, podemos ver que *Coprinopsis cinerea* e *Ustilago maydis* também apresentam apenas 4 genes, os quais apresentam mais de 50% de similaridade com os genes *TRP2* a *TRP5* de *C. neoformans* sorotipos A e D: *TRP2* de *C. cinerea* possui 65,9% de semelhança com *C. neoformans* sorotipo A e 65,8% com D e para *U. maydis* as semelhanças são de 58,7 e 58,3%, respectivamente; Para *TRP3* a similaridade entre *C. cinerea* e *C. neoformans* sorotipo A é de 54,8% e D 54,5%, e para *U. maydis* esses valores são de 52,7 e 53%, respectivamente; *TRP4* de *C. cinerea* possui similaridade com *C. neoformans* sorotipo A de 50,1% e com D de 49,6% e *U. maydis* apresenta similaridade de 42,7% com o sorotipo A e 42,1% com o sorotipo D; Por fim, *TRP5* de *C. neoformans* e *C. cinerea* apresentam 65,7% de similaridade tanto para o sorotipo A quanto D e *U. maydis* apresenta 60,6 e 61,2% de similaridade desse gene com *C. neoformans* sorotipo A e D, respectivamente, mostrando que há uma conservação da organização genômica dessa via dentro dos basidiomicetos.

Tabela 1 - Disposição dos genes da via de biossíntese de triptofano em *E. coli*, *S. cerevisiae* e *C. neoformans*.

<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. neoformans</i>		Atividade Enzimática
trpE	TRP2	CNAG_06679	TRP2	Antranilato Sintase COI
trpG	TRP3	CNAG_04501	TRP3	Antranilato Sintase COII
trpC				Indolglycerol Fosfato Sintase
trpF	TRP1	CNAG_00811	TRP4	Fosforibosil-antranilato Isomerase
trpD	TRP4			Antranilato Fosforibosil Transferase
trpA	TRP5	CNAG_00649	TRP5	Triptofano Sintase
trpB				

Os genes de *C. neoformans* dessa via que são de interesse para esse estudo são *TRP3* (CNAG_04501.2) que codifica uma enzima multifuncional (antranilato sintase componente II, fosforibosil-antranilato isomerase e indolglycerol fosfato sintase) e *TRP5* (CNAG_00649.2) que

codifica a enzima Triptofano Sintase, a qual conduz o último passo bioquímico da via. Em conjunto *TRP3* e 5 atuam no começo, no meio e no final da via biossintética (Figura 3).

Em *C. neoformans* *TRP3* e *TRP5* ainda não foram estudados, portanto é esperado que a deleção destes genes leve a auxotrofia para triptofano, como se observa em outros organismos, mas não se sabe qual o impacto que estas mutações poderiam causar nos fatores de virulência e na sobrevivência deste fungo *in vivo* e *in vitro*. A deleção dos genes e a análise dos mutantes poderão elucidar estas questões. Entretanto, Nosanchuk, Ovalle e Casadevall, (2001) demonstraram que o bloqueio na via do ácido chiquímico pela administração de glifosato inibe a produção dos aminoácidos aromáticos e afeta diretamente a melanização *in vivo*, levando à uma queda na virulência deste fungo patogênico.

Figura 3 - A via de biosíntese do triptofano contendo cinco passos bioquímicos controlados por quatro genes em *C. neoformans*. As setas azuis indicam onde atuam cada uma das enzimas codificadas pelos genes *TRP2*, 3, 4 e 5 e as setas vermelhas onde atuam os inibidores dessa via.

Inúmeros inibidores da via de biossíntese do triptofano foram descritos recentemente (MORYA; KUMARI; KIM, 2011; PAYNE et al., 2005; PAYNE et al., 2009; ZIEBART et al., 2010), muitos dos quais são dirigidos para a antranilato sintase, como 4-carboxipiridina, 4-carboxipiridona, 5-carboxipiridona, ácido 3-(1-Carboxietoxibenzóico) e 2,5-dihidrocorismato, que atuam como competidores desta enzima sobre o antranilado, impedindo sua catálise (PAYNE et al., 2005; PAYNE et al., 2009; PAYNE et al., 2010). No entanto, existem diversos antimetabólitos desta via, que são pequenas moléculas não encontradas naturalmente nos organismos, mas que podem ter funções semelhantes à de metabólitos naturais devido à semelhança estrutural. Esses antimetabólitos podem, eventualmente, atuar da mesma forma que um metabólito correspondente, sendo incorporados e gerando produtos anômalos que se tornam tóxicos para os organismos, prejudicando-os (CAMMACK et al., 1997). Exemplos dessas substâncias são o ácido 5-fluoroantranílico (5-FAA), ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA) e o ácido 5-metilantranílico (5-MAA) que tem um potencial inibidor sobre a antranilato fosforibosil transferase (*TRP4*) e por serem moléculas que não atuam em nenhuma via presente no ser humano, não causariam toxicidade no hospedeiro.

Em relação à enzima trifuncional codificada por *TRP3*, existem substâncias inibitórias da glutamino aminotransferases que atuam sobre esta enzima, ligando-se ao sítio ativo de forma irreversível. Alguns exemplos dessas substâncias são o ácido (α S,5S)- α -amino-3-cloro-4,5-dihidro-5-isoxazoleacético (acivicin), 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON) e o O-diazoacetil-L-serina (azaserine) (CHITTUR et al., 2001). Além deste alvo, também existe um inibidor que atua como competidor do composto 1-(o-carboxifenilamino) 1-desoxiribulose 5-fosfato pelo sítio ativo da enzima indol glicerol fosfato sintase (IGPS) da enzima codificada por *TRP3* e é denominado 4-[(2Z)-2-(1-azabicyclo[2.2.2]octo-3-ilideno)hidrazino]-N-fenil-6-piperidin-1-il-1,3,5-triazin-2-amino (ATB107) (SHEN et al., 2009; SHEN et al., 2010). Vários inibidores que atuam sobre a subunidade β da triptofano sintase têm sido propostos como o Indol 3-propanol fosfato (IPP), glicerol fosfato (GP), indol acetil glicina (IAG) e indol acetil aspartato (IAD), sendo que estes dois últimos representam uma classe de aminoácidos modificados que se ligam alostericamente à enzima e alteram o equilíbrio existente entre as duas subunidades. Outros compostos semelhantes são o indol acetil valina e indol acetil alanina que agem como inibidores competitivos da subunidade α . Vários aminoácidos relacionados à L-serina também podem servir como substrato para as reações que ocorrem na subunidade β , assim como análogos do indol também podem atuar

neste ponto da via de biossíntese, como é o caso da 2,3-dihidroindol (indolina), anilina, fenilhidrazina, hidroxilamina e hidrazina (AMADASI et al., 2007; DUNN et al., 1987; RABONI; BETTATI; MOZZARELLI, 2009; ROY; KEBLAWI; DUNN, 1988).

Apesar da disponibilidade destas substâncias, nenhuma delas foi testada em *C. neoformans*. Se os elementos da via forem validados como bons alvos para o desenvolvimento de novos antifúngicos, reduzindo a sobrevivência ou a virulência, essas substâncias poderão ser testadas como possíveis inibidores específicos em *C. neoformans*, cuja relevância clínica justifica esta busca por novos medicamentos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens de microrganismos e plasmídeos

Todas as linhagens de microrganismos bem como de plasmídeos utilizados estão listados, respectivamente, nas tabelas 2 e 3 abaixo.

Tabela 2 - Lista dos microrganismos utilizados neste trabalho

Microorganismo	Linhagem	Características	Origem
<i>E. coli</i>	HB101	F- mcrB mrr hsdS20(rB- mB-) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(SmR) glnV44 λ-	Promega (Madison, WI, USA)
<i>C. neoformans</i> sorotipo A	H99	Selvagem	Duke University Medical Center
<i>C. gattii</i> sorotipo B	R265	Selvagem	ATCC (MYA-4093) (Manassas, VA, USA)
<i>C. gattii</i> sorotipo C	NIH312	Selvagem	ATCC (34880) (Manassas, VA, USA)
<i>C. neoformans</i> sorotipo D	JEC21	Selvagem	Duke University Medical Center
<i>C. neoformans</i> (JEC21)	CNU004	pGal7::TRP5, NeoR (#31)	Construído neste trabalho
<i>C. neoformans</i> (JEC21)	CNU007	pIBB103 sem inserto	Construído neste trabalho
<i>C. neoformans</i> (JEC21)	CNU026	pIBB103 sem inserto	Construído neste trabalho
<i>C. neoformans</i> (JEC21)	CNU031	pGal7::TRP3, NeoR (#24)	Construído neste trabalho

Tabela 3 - Lista de plasmídeos utilizados neste trabalho

Plasmídeo	Uso	Origem
pLK25	Confere resistência à Geneticina em <i>C. neoformans</i>	Gentilmente cedido pelo Dr. Lukasz Kozubowski (Duke University)
pZPHyg	Confere resistência à Higromicina em <i>C. neoformans</i>	Gentilmente cedido pelo Dr. Joseph Heitman (Duke University)
pIBB103	RNAi	Gentilmente cedido pela Dra. Tamara Doering (Washington University School of Medicine)
pGEM-T	Clonagem de amplicons	Promega
pRP012	RNAi do gene <i>TRP3</i>	Construído neste trabalho
pRP013	RNAi do gene <i>TRP3</i>	Construído neste trabalho
pRP014	RNAi do gene <i>TRP5</i>	Construído neste trabalho
pRP015	RNAi do gene <i>TRP5</i>	Construído neste trabalho
pRP016	RNAi do gene <i>TRP5</i>	Construído neste trabalho
pRP018	RNAi do gene <i>TRP3</i>	Construído neste trabalho
pRP019	RNAi do gene <i>TRP3</i>	Construído neste trabalho
pRP032	RNAi do gene <i>TRP5</i>	Construído neste trabalho
pRP033	RNAi do gene <i>TRP5</i>	Construído neste trabalho
pRP034	RNAi do gene <i>TRP5</i>	Construído neste trabalho
pRP035	RNAi do gene <i>TRP5</i>	Construído neste trabalho

3.2 Oligonucleotídeos

Todos os oligonucleotídeos (primers) usados neste trabalho foram adquiridos pela Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) na escala de 25 η moles com purificação padrão e estão descritos no Apêndice A. Foram feitas soluções estoque desses oligonucleotídeos reconstituídos em água MilliQ estéril de 100 μ M e soluções de trabalho na concentração de 10 μ M.

3.3 Meios de cultura e soluções

Todos os meios de cultura, soluções, vidraria e quaisquer outros materiais, quando necessários, foram esterilizados por autoclavagem a 121 °C, 1 ATM de pressão durante 15 minutos. As esterilizações por filtração (que estão indicadas no texto como tal) foram feitas em filtro com porosidade de 0,22 μ m em frascos previamente autoclavados ou descartáveis.

Meios de cultura sólidos foram acrescidos de 20 g/L de Ágar Bacteriológico (Becton, Dickinson and Co., New Jersey, USA) e para os meios caldo omitiu-se o mesmo.

As leveduras foram cultivadas à 30 °C e as bactérias à 37 °C, quando não descrito de outra forma.

3.3.1 *LB*

Extrato de levedura (Biobasic, Markham, ON, Canada)	5 g/L
Tripton (Himedia, Mumbai, MH, India)	10 g/L
Cloreto de sódio (Synth, Diadema, SP, Brasil)	10 g/L
Água destilada q.s.p.	1 L

3.3.2 *YEPD*

Extrato de levedura (Biobasic)	10 g/L
Peptona Bacteriológica (Himedia)	20 g/L
D-Glicose (Synth)	20 g/L
HCl 1M	5 mL/L
Água destilada q.s.p.	1 L

3.3.3 *YEPD com 1M de Sorbitol*

Extrato de levedura (Biobasic)	10 g/L
Peptona Bacteriológica (Himedia)	20 g/L
D-Glicose (Synth)	20 g/L
Sorbitol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	182,17 g/L (1 M)
HCl 1M	5 mL/L
Água destilada q.s.p.	1 L

3.3.4 *YEPG*

Extrato de levedura (Biobasic)	10 g/L
Peptona Bacteriológica (Himedia)	20 g/L
Solução estoque de 20% de D-Galactose (Sigma-Aldrich)	100 mL/L
HCl 1M	5 mL/L
Água destilada q.s.p.	900 mL

A solução de 20% de D-galactose foi esterilizada por filtração e adicionada ao meio após a autoclavagem do mesmo. Para meio caldo omitiu-se o ágar.

3.3.5 *YNB com sulfato de amônia e D-Glicose ou D-Galactose*

10X YNB com sulfato de amônia e sem aminoácido (Sigma-Aldrich)	100 mL/L
Solução estoque de 20% de D-Glicose (Synth)	100 mL/L
Água destilada q.s.p.	1 L

As soluções de 20% de D-Glicose e 10X YNB foram esterilizadas por filtração e adicionadas ao meio equilibrado à temperatura de 65 °C após a autoclavagem. A fonte de carbono (D-Glicose) pode ser substituída por D-Galactose conforme a aplicação do meio.

3.3.6 *YNB adicionado de Prolina e D-Glicose ou D-Galactose*

10X YNB sem sulfato de amônia e sem aminoácido (Sigma-Aldrich)	100 mL/L
Solução estoque de 430 mM de D-Prolina (Sigma-Aldrich)	100 mL/L
Solução estoque de 20% de D-Glicose (Synth)	100 mL/L
Água destilada q.s.p.	700 mL

As soluções de 20% de D-Glicose, 10X YNB e 430 mM de D-Prolina foram esterilizadas por filtração e adicionadas ao meio equilibrado à temperatura de 65 °C após a autoclavagem. A fonte de carbono (D-Glicose) pode ser substituída por solução estoque de 20% de D-Galactose conforme a aplicação do meio.

3.3.7 *Solução estoque de aminoácidos (200X concentrada)*

L-arginina	5 g/L
L-aspartato	10 g/L
L-fenilalanina	8 g/L
L-glutamato	16 g/L
L-histidina	5 g/L
L-isoleucina	16 g/L
L-leucina	16 g/L
L-lisina	12 g/L
L-metionina	5 g/L
L-serina	75 g/L
L-tirosina	6 g/L
L-treonina	40 g/L
L-triptofano	2 g/L
L-valina	30 g/L

Os aminoácidos foram diluídos em água destilada, esterilizados por filtração e armazenados a 4 °C sob a proteção da luz.

3.3.8 Solução de ácido 5-fluoroantranílico (5-FAA)

Ácido 5-fluoroantranílico (Sigma-Aldrich) 100 mg/mL (644 mM)

O 5-FAA foi diluído em etanol absoluto, esterilizado por filtração e armazenado a 4 °C sob a proteção da luz.

3.3.9 Solução de ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA)

Ácido 3-hidroxiantranílico (Sigma-Aldrich) 100 mg/mL (662 mM)

O 3-HAA foi diluído em etanol absoluto, esterilizado por filtração e armazenado a 4 °C sob a proteção da luz.

3.3.10 Solução de ácido 5-metilantranílico (5-MAA)

Ácido 5-metilantranílico (Sigma-Aldrich) 100 mg/mL (653 mM)

O 5-MAA foi diluído em etanol absoluto, esterilizado por filtração e armazenado a 4 °C sob a proteção da luz.

3.3.11 Solução de ácido 5-fluoroorótico (5-FOA)

Ácido 5-fluoroorótico (Sigma-Aldrich) 10 mg/mL (57 mM)

O 5-FOA foi diluído em água ultra pura, esterilizado por filtração e armazenado à -20 °C sob a proteção da luz.

3.3.12 Solução de 6-Diazo-5-oxo-L-norleucina (DON)

6-Diazo-5-oxo-L-norleucina(Sigma-Aldrich) 5 mg/mL (29 mM)

O DON foi diluído em água ultra pura esterilizado por filtração e armazenado à 4 °C sob a proteção da luz.

3.3.13 Solução de N-(3-indolilacetil)-DL-ácido aspártico (IAAA)

N-(3-indolilacetil)-DL-ácido aspártico (Sigma-Aldrich) 15 mg/mL (51 mM)

O N-(3-indolilacetil)-DL-ácido aspártico foi diluído em água ultra pura, esterilizado por filtração e armazenado à -20 °C sob a proteção da luz.

3.3.14 Solução de N-(3-indolilacetil)-DL-alanina (IAA)

N-(3-indolilacetil)-DL-alanina (Sigma-Aldrich) 5 mg/mL (20,3 mM)

O N-(3-indolilacetil)-DL-alanina foi diluído em água ultra pura, esterilizado por filtração e armazenado à -20 °C sob a proteção da luz.

3.3.15 Solução de N-(3-indolilacetil)-DL-valina (IAV)

N-(3-indolilacetil)-DL-valina (Sigma-Aldrich) 10 mg/mL (36,44 mM)

O N-(3-indolilacetil)-DL-valina foi diluído em água ultra pura contendo 100 mL/L de DMSO, esterilizado por filtração e armazenado à -20 °C sob a proteção da luz.

3.3.16 Solução estoque de triptofano

Triptofano (Sigma-Aldrich) 10 mg/mL (48 mM)

A solução estoque de triptofano foi feita em água ultra pura, esterilizada por filtração e armazenada sob proteção da luz. A concentração final padrão no meio de cultura foi de 20 µg/mL (20 mg/L).

3.3.17 Solução estoque para tampão de corrida de eletroforese (TAE 50X concentrada)

Trizma Base (Carlo Erba, Milano, LM, Itália)	242 g/L (2 M)
Ácido acético glacial (Synth)	57,1 mL/L (2 M)
EDTA 0,5 M pH 8,0	0,1 mL/L (50 mM)
Água MilliQ q.s.p.	1 L

A solução Tampão foi diluída para 1X em água ultra pura para o preparo de gel de agarose e do tampão de corrida.

3.3.18 Gel de agarose 0,8%

Agarose (Sigma-Aldrich)	8 g/L
Tampão TAE (1X) q.s.p.	1 L

A agarose foi dissolvida em microondas. Adicionou-se brometo de etídeo na concentração final de 1,75 µg/mL e verteu-se o gel na forma.

3.3.19 Solução estoque de brometo de etídeo (10 mg/mL)

Brometo de etídeo (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	1 g
Água ultra pura q.s.p.	100 mL

A solução estoque de brometo de etídeo foi mantida à 4 °C fora do alcance da luz.

3.3.20 Tampão da amostra para eletroforese (6x concentrado)

Azul de bromofenol (Synth)	0,25%;
Glicerol (Synth)	30%;
Xileno Cianol (Biorad, Hercules, CA, USA)	0,25%

A solução estoque foi preparada em água ultra pura estéril e armazenada à 4 °C.

3.3.21 Solução de Higromicina

Higromicina (Thermo Fisher Scientific) 50 mg/mL

A solução estoque foi mantida a 4 °C e diluída no momento do uso para a concentração final de 200 µg/mL.

3.3.22 Solução de Geneticina (G418)

G418 (Thermo Fisher Scientific) 200 mg/mL

A solução estoque foi feita em água ultra pura estéril, esterilizada por filtração e estocada à -20 °C até o momento do uso, quando foi diluída para a concentração final de 200 µg/mL.

3.3.23 Solução de Ampicilina

Ampicilina sódica (Sigma-Aldrich) 50 mg/mL

A solução estoque foi preparada em etanol 70%, estocada à - 20 °C e diluída no momento do uso para a concentração final de 100 µg/mL.

3.3.24 Tampão TENTS de extração de DNA de levedura

Tris HCl 1M pH 7,5	10 mL/L (10 mM)
NaCl 5 M	20 mL/L (100 mM)
EDTA 0,5 M pH 8,0	2 mL/L (1 mM)
Triton X-100 (Synth)	20 mL/L (34 mM)
SDS	10 mL/L (140 mM)
Água ultra pura q.s.p.	1 L

A solução foi esterilizada por filtração e mantida a temperatura ambiente.

3.3.25 Tris-EDTA (TE)

Tris HCl pH 7,5	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

A solução foi autoclavada e mantida em temperatura ambiente.

3.3.26 Solução de RNase

RNase

10 mg/mL

A solução foi preparada em água ultra pura, esterilizada por filtração e armazenada a -20 °C.

3.4 Extração de DNA Plasmidial

Para extração de plasmídeos de interesse em bactérias, estas foram cultivadas em 3 mL de meio LB caldo (líquido) contendo 100 µg/mL de ampicilina por 16 horas a 37 °C sob agitação. As células foram coletadas e a extração feita com kit de extração de DNA plasmidial *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Germantown, MD, USA) conforme protocolo do produto.

3.5 Extração de DNA Genômico

Os microrganismos foram cultivados em 5 mL de YEPD líquido por 24 horas, as células foram coletadas por centrifugação (rotação de 4000 rpm por 10 minutos), ressuspensas em tampão TENTS e colocadas em um tubo novo de centrífuga, nos quais foram adicionadas três gramas de pérolas de vidro e 0,5 mL de fenol-clorofórmio. Os tubos foram vortexados por 5-10 minutos e centrifugados a temperatura ambiente (4 minutos a 8000 rpm). A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de centrífuga onde foram adicionados 50 µL de NaAC 3 M e 1 mL de etanol absoluto. O DNA foi precipitado por centrifugação (20 minutos a 13000 rpm a 4 °C), o sobrenadante foi descartado, e acrescentou-se 0,5 mL de etanol 70% para lavagem por centrifugação (5 minutos a 13000 rpm) e o sobrenadante descartado novamente. O pellet foi ressuspendido em 50 µL de solução de TE contendo 10 µg/mL de RNase A e os tubos foram incubados a temperatura ambiente ou em banho a 30 °C por 30 minutos. Quantificou-se a concentração de DNA em todos os tubos utilizando o equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) e os tubos foram armazenados a -20 °C.

3.6 Deleção da região codificadora dos genes da via de síntese de triptofano

As construções para deleção de genes foram feitas pela metodologia de PCR de fusão descrita por Davidson et al. (2002). Essa técnica consiste, resumidamente, em amplificar por PCR

as regiões flanqueadoras dos *loci* a serem deletados (braço direito e braço esquerdo) utilizando o DNA genômico da linhagem H99 de *C. neoformans* e primers específicos listados no Apêndice A. Os marcadores seletivos, genes responsáveis por conferir resistência a antibióticos também foram amplificados por PCR usando como molde os DNAs plasmidiais de pLK25 e pZPHyg que contém os genes, respectivamente, *Neo^R* que confere resistência a geneticina e o gene *HpH^R* que confere resistência a higromicina. Todas as amplificações foram feitas no volume final de 50 µL com 1 Unidade da polimerase termoestável *ExTaq* (Takara, Mountain View, CA, USA) no tampão de reação recomendado pelo fabricante (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl e 1,5 mM MgCl₂), 0,2 µM de cada primer e 2 µM de dNTP's. As amplificações foram conduzidas em termociclador da seguinte forma: 1 ciclo inicial de 5 minutos a 94 °C, 35 ciclos, sendo em que cada um deles a temperatura de denaturação foi de 94 °C por 30 segundos, anelamento a 52 °C por 30 segundos e extensão por 2 minutos a 72 °C; foi feita uma extensão final de 72 °C por 7 minutos. Os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador e a captura das imagens foi feita em fotodocumentador LPix (Loccus, Cotia, SP, Brasil) com filtro de cor laranja. As bandas de interesse foram recortadas do gel com auxílio de uma lâmina e o DNA foi purificado do fragmento de agarose com kit de purificação de ácidos nucleicos (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Após quantificação em Nanodrop (Thermo Fisher Scientific), os fragmentos de DNA correspondentes ao braço esquerdo, marcador seletivo e braço direito de cada gene foram fusionados em uma única molécula por PCR. Nesta reação adicionou-se quantidades aproximadamente iguais dos 3 DNAs (100 ng) obtidos na primeira amplificação, 1 Unidade da polimerase termoestável *ExTaq* (Takara), tampão de reação recomendado pelo fabricante (10 mM Tris- HCl, 50 mM KCl e 1,5 mM MgCl₂), 0,2 µM de cada primer e 2 µM de dNTP's. As amplificações foram conduzidas em termociclador da BioRad da seguinte forma: 1 ciclo inicial de 5 minutos a 95 °C, 35 ciclos, sendo em que cada um deles a temperatura de denaturação foi de 95 °C por 30 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos e extensão por 3 minutos a 72 °C; foi feita uma extensão final de 72 °C por 7 minutos. Os amplicons foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e observados como descrito acima.

3.7 Clonagem e transformação de *E. coli*

As construções $\Delta trp3::HphR$, $\Delta trp3::NeoR$, e $\Delta trp5::HphR$ obtidas in vitro por PCR de fusão foram clonadas no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega), segundo as instruções do fabricante. Foi feita a ligação do inserto ao vetor com T4 DNA ligase, e 2 μ L da reação de ligação foram usados para transformação de *E. coli* HB101 por eletroporação, conforme o protocolo pré-estabelecido do equipamento (GenePulser, BioRad). Após o eletrochoque, as células foram crescidas em 1 mL de LB por 1 hora, a 37 °C e 150 rpms. Em seguida, foi feita centrifugação por 3 minutos e as células foram ressuspensas em 100 μ L de meio LB líquido e plaqueadas em meio LB sólido acrescido de 100 μ g/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa por 16 horas.

3.8 Transformação de *C. neoformans* por biolística (Toffaletti et al., 1993)

A linhagem H99 de *C. neoformans* foi inoculada em 50 mL de meio YEPD com agitação de 150 rpm, a 30 °C por um período de 16 a 20 horas. As células foram centrifugadas (3220 g por 15 minutos), lavadas com água estéril e ressuspensas em 500 μ L de água destilada esterilizada. Este volume foi espalhado homogeneamente em duas placas contendo meio YEPD contendo 1 M de sorbitol com auxílio de uma alça de Drigalski. O DNA para transformação por biolística foi preparado da seguinte forma: adicionou-se aproximadamente 1 μ g de DNA concentrado a 50 μ L de partículas de ouro (0,6 μ m) suspensas em etanol ou 50% de glicerol em um eppendorf estéril. O material foi então agitado em vortex por 5 segundos, adicionou-se 50 μ L de $CaCl_2$ (2,5 M) e agitou-se em vortex por 5 segundos; adicionou-se 20 μ L de espermidina (1 M) e a amostra foi agitada em vortex e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi feita centrifugação para remoção do sobrenadante, e as partículas foram lavadas em 140 μ L de etanol 70%, centrifugou-se novamente e lavou-se com 140 μ L etanol absoluto. Após a centrifugação as partículas de ouro recobertas com DNA foram ressuspensas em 10 μ L de etanol 100%. Este volume foi dividido em duas alíquotas de 5 μ L, as quais foram aplicadas sobre dois macrocarreadores previamente esterilizados com etanol 100%. Os discos foram arranjados no suporte e procedeu-se com o bombardeamento. Os parâmetros usados foram: 1350 psi de pressão, 60 mm de distância entre o macrocarreador e a placa. Após 48 horas de incubação a 30 °C, as células foram removidas da placa com auxílio de uma espátula estéril e 10 mL de água MilliQ

estéril e foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL. As células foram precipitadas por centrifugação a 3220 g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido, as células foram ressuspensas em 500 µL de água MilliQ estéril e semeadas nos seguintes meios: YEPD adicionado do agente seletivo: 200 µg/mL de geneticina (Thermo Fisher Scientific) ou 200 µg/mL de higromicina (Thermo Fisher Scientific). A seleção em YNB com sulfato de amônia, aminoácidos e ácido 5-fluoroantranílico (5-FAA) foi realizada em meio de cultura descrito por Toyn et al. (2000). Em todos os casos as placas foram incubadas a 30 °C por um período superior a 48 horas ou até que as colônias recombinantes pudessem ser visualizadas.

3.9 Análise de auxotrofia

Após o cultivo na presença de higromicina ou neomicina ou 5-FAA, os transformantes foram selecionados, numerados e repicados para novas placas de seleção (YPD + G418 ou YPD + Higromicina ou YNB + 5-FAA) a 30 °C por 48 horas. Após o segundo repique, os transformantes foram testados quanto à capacidade de crescer em YNB mais sulfato de amônia com e sem triptofano. As placas foram então incubadas a 30 °C por 24 horas ou até que o crescimento pudesse ser observado.

3.10 PCR padrão e diagnóstico

A partir de 100 ng de material genético ou 1 colônia, adicionou-se 1 Unidade de Taq Polimerase, 0,2 µM dos primers específicos, 0,2 µM de dNTP's, 2 mM de Mg₂SO₄ e 1X tampão da enzima Taq polimerase transferidos para tubos de PCR de 0,2 mL. As amplificações foram feitas nas seguintes condições: 1 ciclo de 95 °C por 5 minutos, 35 ciclos em que as amostras foram submetidas a temperatura de 95 °C por 30 segundos, 30 segundos na temperatura de anelamento específico do primer utilizado, e 72 °C por 1 minuto a cada 1000 pares de base do produto. No último ciclo, foi feita uma extensão final por 7 minutos a 72 °C. As amplificações foram observadas em gel de agarose conforme descrito anteriormente. As amostras que apresentaram a banda com tamanho aproximado do esperado, quando eram resultado de inserção plasmidial, foram semeadas em 3 mL de meio LB líquido contendo antibiótico de seleção e cultivadas a 37 °C por 16 horas sob agitação de 150 rpms. Procedeu-se com a extração de plasmídeo destas culturas usando o kit de extração de DNA plasmidial da Qiagen (QIAPrep Spin Miniprep Kit). Os DNAs plasmidiais foram

digeridos com as enzimas de restrição diagnósticas específicas para confirmar a identidade dos mesmos. As reações de digestão foram preparadas no volume de 20 µL, contendo 1 µg do DNA plasmidial, 5 Unidades de enzima e 1X tampão da enzima correspondente, como recomendado pelo fabricante. As reações foram incubadas durante 2 horas a 37 °C, exceto enzimas cujo protocolo requeresse outra temperatura. Os produtos das digestões foram observados em gel de agarose conforme descrito anteriormente.

3.11 Silenciamento gênico pós-transcricional por RNAi

Os experimentos de silenciamento gênico pós-transcricional por RNAi foram feitos segundo Skowrya e Doering (2012). Resumidamente, amplificou-se um fragmento de até 500 pb a partir de DNA genômico extraído da linhagem JEC21 de *C. neoformans* sorotipo D. Os primers usados nesta amplificação foram específicos para cada gene e carregavam um sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *SpeI* na região 5'. A reação de amplificação foi realizada em 50 µL contendo 1 Unidade de Taq Polimerase (Thermo Fisher Scientific), 0,2 µM dos primers específico e 2 µM de dNTP's. A condição de amplificação foi: o primeiro ciclo a 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos em que a temperatura foi de 94 °C por 30 segundos, 62 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, e um ciclo de extensão final de 7 minutos. O DNA obtido nesta amplificação foi purificado com kit da Qiagen (QIAprep Spin Miniprep Kit), concentrado sob vácuo e ressuspendido em 5 µL de água MilliQ estéril. A este volume adicionou-se 5 Unidades da enzima de restrição *SpeI* (Sigma-Aldrich), o tampão apropriado para a enzima (conforme as instruções do fabricante) e completou-se o volume para 20 µL. A reação foi conduzida durante 2 horas a 37 °C. Após este período o DNA digerido foi purificado com kit Qiagen (QIAquick PCR Purification Kit). O equivalente a 1 µg do vetor pIBB103 foi digerido com a enzima de restrição *SpeI* nas mesmas condições descritas acima. Após a confirmação da digestão por eletroforese em gel de agarose 0,8% o fragmento linear foi defosforilado com 10 Unidades de fosfatase alcalina derivada de camarão (SAP, Thermo Fisher Scientific) a 37 °C durante 10 minutos. Procedeu-se com a inativação desta enzima aquecendo-se a reação por 15 minutos a 75 °C. Foi feita então a ligação entre o inserto digerido com *SpeI* e o vetor pIBB103 digerido com a mesma enzima de restrição e defosforilado. A ligação foi feita na presença de 10 Unidades da enzima T4 ligase (Fermentas), 50 ng do vetor, 150 ng do inserto e o tampão de reação recomendado pelo fabricante. A reação de ligação ocorreu por 16 horas a 16 °C. 2 µL da ligação foram transformados em *E. coli* HB101 por eletroporação, segundo descrito

anteriormente. As células foram então plaqueadas em LB com ampicilina e incubadas a 37 °C. Após um período de 16 a 20 horas, as colônias crescidas foram submetidas a extração de DNA plasmidial seguido de digestão pela enzima de restrição *SpeI* e eletroforese, afim de verificar a presença do inserto no plasmídeo. As amostras que apresentaram o inserto do tamanho correto foram digeridas com *I-SceI* (Fermentas) por 16 horas a 37 °C, e as linearizações foram confirmadas por eletroforese. Por fim, os DNAs plasmidiais linearizados foram purificados com kit da Qiagen (QIAprep PCR Purification Kit) e introduzidos por biolística na linhagem JEC21 de *C. neoformans* sorotipo D. Os transformantes foram selecionados na presença de YEPD + G418 como agente seletivo.

3.12 Indução do silenciamento gênico pós-transcricional por RNAi

Cinquenta transformantes foram repicados para placas contendo YEPD + G418 e em seguida testados nos meios de indução ou repressão apresentados na tabela 4. Cada indução foi feita apenas uma vez em placa de petri e o resultado observado após 48 horas.

Tabela 4 - Meios de cultivo indutores e repressores do silenciamento gênico pós-transcricional por RNAi.

Meio de cultivo	Silenciamento gênico pós-transcricional*
YEPD + G418	R
YEPG + G418	I
YNB + Dextrose + Triptofano	R
YNB + Dextrose - Triptofano	R
YNB + Galactose + Triptofano	I
YNB + Galactose - Triptofano	I

*Indução (I) ou Repressão (R)

3.13 Avaliação do crescimento por diluição seriada

O microrganismo a ser testado foi cultivado em tubo de ensaio contendo meio líquido ou em placas de petri contendo meio sólido durante um período de 16 a 24 horas a 30 °C, com agitação no caso de meio líquido (150 rpm). As células foram coletadas por raspagem da placa e ressuspensas em água e centrifugadas (3220 g, 10 minutos), no caso do meio líquido, este foi centrifugado, o líquido descartado e o restante ressuspensado em água e centrifugado novamente. Em ambos os casos os microrganismos foram ressuspensos em água MilliQ estéril, contadas em câmara de Neubauer, e diluídas seriadamente no volume de 1 mL para uma concentração de 2 x

10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 e 2×10^2 células/mL. Um volume de 5 μ L de cada diluição foi inoculado com auxílio de uma micropipeta em placas de petri contendo os meios de cultivo apropriado e as placas incubadas a 30 °C por 48 horas a 72 horas. As imagens foram registradas em câmera fotográfica sobre fundo escuro para melhor visualização das colônias.

3.14 Extração Total de RNA

A partir de uma colônia isolada, inoculou-se 25 mL de meio YEPD líquido, o crescimento se deu por 16 a 24 horas sob agitação de 150 rpms a 30 °C. As células foram coletadas por centrifugação a 4000 rpms, ressuspensas em água ultra pura estéril e centrifugadas novamente e inoculadas em 25 mL do meio indutor. Após 4 horas sob agitação a 30 °C foram feitas alíquotas na concentração de 3×10^8 células/mL em tubos de 2 mL de rosca. A este tubo adicionou-se 750 μ L de Trizol (Thermo Fisher Scientific) e 3 g de pérolas de vidro e estes foram agitados seis vezes, durante um minuto cada uma, alternando as agitações com dois minutos de repouso em gelo. Ao fim do último repouso, transferiu-se o sobrenadante dos tubos para tubos novos e acrescentou-se mais 750 μ L de Trizol aos tubos com as pérolas de vidro, que foram agitados novamente e juntou-se o sobrenadante destes tubos com o dos tubos novos. A estes novos tubos adicionou-se aproximadamente 10% do volume de clorofórmio, foram agitados por 20 segundos e centrifugados por 15 minutos a 10.000 rpm e 4 °C. Transferiu-se o sobrenadante destes tubos para tubos novos, acrescentou-se 500 μ L de isopropanol absoluto, os tubos foram agitados por inversão e deixados a temperatura ambiente por 10 minutos. Foram centrifugados novamente a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado, acrescentou-se 700 μ L de etanol 70% com 1% de DEPC (Dicarbonato de dietila), os tubos foram então agitados novamente e centrifugados a 8.000 rpm por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. Após secagem completa do etanol, adicionou-se 250 μ L de água ultra pura com 1% de DEPC e os tubos foram deixados a 60 °C por 10 minutos para dissolução do pellet e, posteriormente, armazenados em freezer a -20 °C.

3.15 Síntese de cDNA

A síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total foi feita com o kit *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit* (Thermo Fisher Scientific). A partir de 5 μ g de RNA total extraído, adicionou-se 200 unidades de RevertAid H Minus M-MuLV Reverse

Transcriptase (enzima de transcriptase reversa) 5 μ M dos primers Oligo (dT), 1 mM de dNTP's, 20 unidades de RiboLock RNase Inibitor, 1X tampão síntese de cDNA e completado o volume com água tratada com DEPC, tudo em tubos de PCR de 0,2 mL. As reações foram feitas nas seguintes condições: 1 ciclo de 42 °C por 1 hora e 1 ciclo de 70 °C por 5 minutos. Os tubos foram armazenados a -20 °C.

3.16 PCR em tempo real

Todas as reações de PCR em tempo real foram feitas com equipamento, softwares e reagentes da Life Technologies (Thermo Fisher Scientific). O termociclador foi o *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* e as reações foram feitas em placas *MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode*, utilizando-se o master mix *Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit* contendo a enzima Taq Polimerase diluído 1X, que foi utilizado conforme protocolo do fabricante. A concentração mínima de amplificação de cada par de primer foi testada previamente em reações padrão de método CT comparativo para quantificação, conforme aqui descritas, na qual variaram entre 30 e 100 nM. As concentrações finais utilizadas para os genes da via de biossíntese de triptofano e para os genes de permeases foram de 60 nM, enquanto que para o gene GPDH foi de 30 nM.

O software do equipamento é o *StepOne Software v2.3*, no qual todas as configurações utilizadas foram padrão para o método CT comparativo para quantificação relativa ($\Delta\Delta CT$) considerando-se o reagente *SYBR® Green* e reações padrão (Standart) e sempre em triplicata para cada amostra. A única modificação foi em relação à temperatura de anelamento, onde sempre foi utilizada aquela cujo par de primers tivesse a menor temperatura na placa. Após a reação os dados foram tratados, aceitando-se ou recusando-se os dados de cada poço no próprio software e em seguida foram analisados no software *ExpressionSuit Software v1.0.3*, onde foram gerados os dados para construções dos gráficos de expressão comparativos entre diferentes tratamentos.

3.17 Testes Estatísticos

Todos os testes estatísticos foram feitos com o software *Prism 5.01* (GraphPad, San Diego, CA, EUA). A validação dos resultados de PCR em tempo real foi feita pelo método de Teste-T não pareado quando utilizadas amostras com dois tratamentos diferentes (RNAi) e ANOVA One-way

com posterior análise Tukey quando utilizados mais de dois tratamentos, comparando-os entre si. Em ambos os testes considerou-se o valor de p menor que 0,05 para ser significativo.

3.18 Testes com Inibidores

Todos os testes com inibidores foram feitos em placas contendo meios de cultura YEPD ou YNB (glicose e sulfato de amônia) contendo diferentes concentrações dos inibidores. Os antimetabólitos ácido 5-fluoroantranílico, ácido 3-hidroxiantranílico e ácido 5-metilantranílico foram usados na concentração de 5 µg/mL em placa, enquanto que o inibidor de *TRP3* 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON) foi utilizado nas concentrações de 31,25; 62,5; 125 e 250 µM e os inibidores de *TRP5* N-(3-indolilacetil)-DL-ácido aspártico e N-(3-indolilacetil)-L-alanina foram utilizados nas concentrações de 6,8; 13,6 e 27,2 mM enquanto que o N-(3-indolilacetil)-L-valine foi usado em concentrações diferentes, sendo de 5,1; 6,8 e 13,6 mM. Em todos os testes, as linhagens de *C. neoformans* ou *C. gattii* a serem testadas foram inoculadas em meio YEPD líquido e deixadas sob agitação a 30 °C por 24 horas, quando então foram centrifugadas (10 minutos a 4000 rpm) e o meio descartado e em seguida foram feitas duas lavagens seguidas, onde os pellets foram ressuspensos em água ultrapura, centrifugados novamente nas mesmas condições e a água descartada. Foram feitas diluições seriadas da cultura em concentrações de 2×10^6 a 2×10^2 células/mL e inoculados 5 µL de cada uma delas, totalizando um quantidade de 10.000, 1000, 100, 10 e 1 célula em cada inoculo e após 48 horas tiveram seu crescimento analisado.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação e caracterização dos genes *TRP3* e *TRP5* *in silico*

Os genes *TRP3* e *TRP5* foram primeiramente identificados a partir da pesquisa de similaridade de sequência de proteínas ortólogas da antranilato sintase componente II e triptofano sintase de *S. cerevisiae* e aquelas contidas no banco de dados de *C. neoformans* sorotipo A (Broad Institute, Cambridge, MA, USA) utilizando a ferramenta BLASTp. *S. cerevisiae* foi usada porque o genoma é extremamente bem anotado e existem muitas informações sobre as vias metabólicas nesta levedura que podem ser úteis e aplicáveis a outros organismos, sendo considerada uma levedura de referência. Para maiores detalhes consultar o site “Saccharomyces Genome Database” (<http://www.yeastgenome.org/>) (Stanford University, Stanford, CA, USA). Além disso, há grande conservação de estrutura e função entre estas duas leveduras.

A análise dos dois *loci* revelaram as características básicas dos genes que estão sumarizadas na Tabela 5. As sequências de aminoácidos de *TRP3* e *TRP5* de *C. neoformans* sorotipo D foram obtidas pela pesquisa de similaridade usando as proteínas Trp3p e Trp5p de *C. neoformans* sorotipo A. A comparação entre sorotipos mostra que a localização cromossômica é conservada entre os sorotipos nos dois genes e, além disso, ambos os genes possuem regiões codificadoras e o tamanho das proteínas semelhantes quando se consideram os dois sorotipos. O alinhamento das sequências de aminoácidos de Trp3p e Trp5p entre os sorotipos A e D mostra que as proteínas têm alto grau de identidade: 97,5% para *TRP3* e 98,6% para *TRP5*.

Tabela 5 - Organização genômica dos genes da via de biossíntese do triptofano em *C. neoformans* sorotipos A e D.

Gene (Referência)	Função enzimática	Cromossomo	Gene	Aminoácidos
<i>TRP3</i> sorotipo A (CNAG_04501.2)	AS CO II (glutamina aminotransferase) Fosforibosil-antranilato isomerase Indol glicerol fosfato sintase	9	2396	752
<i>TRP5</i> sorotipo A (CNAG_00649.2)	Triptofano sintase	1	2645	715
<i>TRP3</i> sorotipo D (CNI 00560)	AS CO II (glutamina aminotransferase) Fosforibosil-antranilato isomerase Indol glicerol fosfato sintase	9	2449	752
<i>TRP5</i> sorotipo D (CNA 06290)	Triptofano sintase	1	2623	715

A dedução da sequência de aminoácidos de *TRP3* mostrou que este codifica uma proteína com 52% de identidade com *TRP3* de *S. cerevisiae*. Neste fungo, sabe-se que o gene *TRP3* codifica uma proteína bifuncional, isto é: antranilato sintase componente II (AS COII) e a indol glicerol fosfato sintase (IGPS), as quais conduzem o primeiro e o quarto passo bioquímico na conversão do corismato em triptofano, respectivamente (Figura 3). Além da similaridade com *TRP3* de *S. cerevisiae*, a análise da proteína codificada pelo gene *TRP3* de *C. neoformans* demonstrou que a porção carboxi-terminal da mesma, possui similaridade de sequência com *TRP1* de *S. cerevisiae*, o qual codifica uma fosforibosil antranilato isomerase (PRAI) Esta proteína atua no terceiro passo da via. As análises *in silico* demonstraram que, ao contrário do que se observa em *S. cerevisiae*, em *C. neoformans* *TRP3* é uma proteína trifuncional. Em relação a outros fungos, *TRP3* demonstrou a mesma estrutura trifuncional em *Ustilago maydis*, *Coprinopsis cinerea*, *Aspergillus fumigatus*, *Ajellomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Paracoccidioides brasiliensis*, sendo que a maior similaridade ocorre entre *C. cinerea* e *C. neoformans* sorotipo A (54,8% identidade) e D (54,5%), seguido por *U. maydis* (52,7 e 53%, respectivamente).

Em relação a *TRP5*, a dedução da sequência de nucleotídeos demonstra que a mesma codifica a triptofano sintase (TS). As mesmas análises demonstraram que existe uma identidade de 52,8% entre *C. neoformans* sorotipo A e *S. cerevisiae*. Ainda, as duas subunidades proteicas (α e β) que compõe a atividade catalítica da TS, as quais estão em proteínas separadas em *E. coli*, mas em *C. neoformans* e em *S. cerevisiae* se encontram fundidas. Quanto aos demais fungos pesquisados esta proteína tem grande similaridade de sequência com *C. cinerea* (65,7% identidade para o sorotipo A e D) e *U. maydis* com 60,6 e 61,2% de identidade com a TS de *C. neoformans* sorotipo A e D, respectivamente.

A identificação e a caracterização *in silico* destes genes, bem como dos demais (*TRP2* e *TRP4*), são indicativos de que *C. neoformans* possa ter a capacidade para sintetizar triptofano, restando saber então se essa via de biossíntese é de fato funcional neste organismo.

4.2 Ação dos antimetabólicos na via de biossíntese do triptofano

Uma forma de evidenciar a presença de uma via funcional de biossíntese de triptofano em *C. neoformans* é por meio de antimetabólitos. Algumas substâncias análogas à metabólitos intermediários da via do triptofano atuam como antimetabólitos: 5-Fluoroindol (5-FI) em *Pseudomonas putida*, *C. cinereus* e *S. cerevisiae* (MAURER; CRAWFORD, 1971), ácido 5-

metilantranílico (5-MAA) em *E. coli* (ZURAWSKI et al., 1978) e ácido 5-fluoroantranílico (5-FAA) em *S. cerevisiae* (TOYN et al., 2000).

Não há relatos na literatura que demonstrem a ação destes antimetabólitos na via de biossíntese do triptofano em *C. neoformans*. Considerando a potencial que estes antimetabólitos podem ter como agentes seletivos e até mesmo do ponto de vista de antimicrobianos, a linhagem de *C. neoformans* sorotipo A (H99) foi testada frente a 3 antimetabólitos (5-FAA, 3-HAA e 5-MAA) em duas condições de crescimento diferentes: meio rico YEPD e meio sintético YNB acrescido de sulfato de amônia, 5% de glicose, triptofano e solução de aminoácidos, conforme descrito nos materiais e métodos. A Figura 4 mostra os resultados destes experimentos. É possível observar que a melhor inibição é dada por 5 µg/mL de 5-FAA em meio sintético YNB. Os demais inibidores apresentaram baixa inibição.

Figura 4 - Ação dos antimetabólitos ácido 5-Fluoroantranílico (5-FAA), ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA) e ácido 5-metilantranílico (5-MAA) em *C. neoformans* em meio rico YEPD e meio sintético YNB à 30 °C por 72 horas. Os inibidores foram usados na concentração final de 5 µg/mL. NI = No Inhibitor. As fórmulas estruturais foram representadas para destacar a mudança dos radicais flúor, hidroxila e metila.

Esse resultado demonstrou que, de fato, a via de biossíntese de triptofano é funcional em *C. neoformans* e a ação dos antimetabólitos usados foram confirmados nesse organismo, uma vez que sua presença provocou inibição de crescimento nos testes em placa.

4.3 Inativação dos genes *TRP3* e *TRP5* em *C. neoformans* sorotipo A

O objetivo central deste trabalho é validar o uso da via de biossíntese do triptofano como alvo de molecular de antifúngicos. A estratégia para testar esta hipótese foi deletar os genes *TRP3* e *TRP5* de *C. neoformans* e avaliar o efeito que estas mutações auxotróficas tem sobre os fatores de virulência, a sobrevivência da levedura e a capacidade de causar doença.

As moléculas de DNA recombinante obtidas *in vitro* para substituição da região codificadora de *TRP3* e *TRP5* por um marcador de seleção de resistência à antibiótico foram feitas pela metodologia de PCR de sobreposição descrita por Davidson et al. (2002). As deleções foram feitas a partir do códon de iniciação (ATG) até o códon de terminação (TGA ou TAA). Da região codificadora de *TRP3* e *TRP5* foram deletados 2396 e 2645 pb, respectivamente. Em cada caso, o PCR de sobreposição foi feito de forma que o marcador de seleção fosse flanqueado por 600 pb homólogos ao promotor e ao terminador de cada gene a ser deletado, garantindo assim as sequencias necessárias para dirigir a integração homóloga da construção no genoma da linhagem H99 de *C. neoformans*.

A Figura 5A mostra uma eletroforese típica onde, primeiramente foram obtidos os 3 fragmentos de DNA correspondentes ao marcador de seleção (MS), amplificado a partir de DNA plasmidial e as duas regiões flanqueadoras (BE e BD), as quais foram amplificadas a partir de gDNA da linhagem H99. Uma vez obtidos, os 3 fragmentos de DNA foram purificados, concentrados e consolidados em uma única molécula quimérica de DNA por PCR de sobreposição (Figura 5B).

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose mostrando a construção de $\Delta trp3::Hph^R$ por PCR de sobreposição. A) primeiro passo de PCR de sobreposição, BE e BD são, respectivamente, os braços esquerdo e direito da construção, homólogos às regiões flanqueadoras do gene *TRP3*; MS é o marcador de seleção Hph^R , ou seja, o gene de resistência a higromicina; B) Fusão é a junção dos fragmentos dos dois braços com o marcador de seleção, formando o $\Delta trp3::Hph^R$. Kb = kilobases, pb = pares de bases. Essa construção é representativa para $trp3::Neo^R$ e $trp5::Neo^R$.

As construções $\Delta trp5::Hph^R$ e $\Delta trp3::Neo^R$ foram introduzidos em *C. neoformans* Sorotipo A (H99) por biolística pela metodologia de Toffaletti et al. (1983) e selecionados em YEPD suplementado com antibiótico apropriado. Os transformantes foram purificados por repicagem no mesmo meio em que foram selecionados após a transformação e testados quanto à auxotrofia para triptofano. No total, entre *TRP3* e *TRP5* foram analisados 776 transformantes, sem que nenhum fosse auxotrófico (Tabela 6). Diante da inexistência de mutantes auxotróficos, o método de seleção foi modificado, aplicou-se uma seleção em meio sintético YNB contendo sulfato de amônia, 5% de glicose, um pool de aminoácidos e o ácido 5-fluoantranílico (5-FAA). O racional deste tipo de seleção foi que os mutantes $\Delta trp5::Hph^R$ e $\Delta trp3::Neo^R$ seriam resistentes ao 5-FAA e o tipo selvagem sensível. Desta forma os transformantes que sobrevivessem após esta seleção seriam mais facilmente identificados e teriam uma grande chance de serem mutantes. A tabela 6 mostra os resultados da seleção com 5-FAA onde nenhum mutante auxotrófico foi identificado.

Tabela 6 - Transformantes recuperados na biolística por meio de seleção e gene deletado.

Deleção	YEPD + antibiótico de seleção	YNB + 5-FAA	Transformantes com Fenótipo Auxotrófico
<i>TRP3</i>	400	169	0
<i>TRP5</i>	376	99	0
Total	776	268	0

Esse resultado nos permitiu formular duas hipóteses para explicar a inexistência de transformantes com integração homóloga: na primeira, haveria mais de uma cópia de cada um dos

genes analisados no genoma de *C. neoformans* e na segunda hipótese, a via de biossíntese do triptofano seria essencial e as deleções dos genes *TRP3* e *TRP5* seriam letais, originando mutantes que não sobrevivem.

A pesquisa *in silico* sugeriu que não há outras cópias destes genes, e já se sabe da literatura que *TRP3* possui apenas uma cópia no genoma de *C. neoformans* (PERFECT et al., 1992). No caso de *TRP5*, 6 transformantes selecionados em 5-FAA e 5 selecionados em YEPD mais antibiótico foram submetidos à southern blot com o intuito de se observar o número de cópias de *TRP5*. Nenhum transformante selecionado em YNB + 5-FAA apresentou banda correspondente à integração homóloga, sendo, portanto considerados falsos positivos, enquanto que em YEPD os transformantes apresentaram a banda correspondente ao do indivíduo selvagem e uma banda heteróloga, que conferiu a resistência ao antibiótico de seleção (dados não mostrados). Concluímos, a partir destes resultados, que não há uma segunda cópia desses genes no genoma do fungo e que, portanto, a primeira hipótese pode ser descartada, restando saber então se esta via é essencial ao patógeno de estudo.

4.4 Interferência gênica por RNAi

4.4.1 Silenciamento dos genes *TRP3* e *TRP5*

Uma das ferramentas de biologia molecular que pode ser usada no controle pós-transcricional é o RNA de interferência (RNAi), que é desencadeado pela presença de um RNA dupla fita (dsRNA). Esse mecanismo é natural de diversos organismos, inclusive de *C. neoformans* Sorotipo D e foi utilizado aqui para demonstrar, através do controle da expressão gênica se os genes da via de biossíntese do triptofano são essenciais a este patógeno. Para esse experimento, utilizou-se o plasmídeo pIBB103 (SKOWYRA; DOERING 2012) o qual contém dois promotores convergentes Gal7, entre os quais se pode clonar um amplicon de até 500 pb com homologia à sequência do gene que se deseja silenciar. A expressão do RNA interferente é induzida na presença de galactose (fenótipo mutante) e reprimida na presença de dextrose (fenótipo selvagem), permitindo assim o controle da expressão do dsRNA que irá interferir na expressão dos genes alvo (*TRP3* e *TRP5*).

Foram obtidos dois amplicons (280 pb para *TRP3* e 233 pb para *TRP5*) da região codificadora de cada gene, os quais foram clonados no sítio de restrição *SpeI* do plasmídeo

pIBB103, o qual fica entre os dois promotores Gal7 convergentes. As construções (*Trp3i* e *Trp5i*) foram propagadas em *E. coli*, os plasmídeos recombinantes e o plasmídeo controle (pIBB103 sem inserto) foram digeridos com a enzima de restrição I-SceI e introduzidos na linhagem JEC21 de *C. neoformans* sorotipo D por biolística. Os transformantes foram selecionados em YEPD + G418 e após dois ciclos de purificação por repicagem no meio seletivo, 50 transformantes de cada transformação foram testados quanto à capacidade de crescer nos meio indutor (YEP + Galactose) e meio repressor (YEP + Dextrose). Todos os 50 transformantes contendo o plasmídeo controle (pIBB103 sem inserto) cresceram nas duas condições, por outro lado, 18 e 21 transformantes contendo os plasmídeos *Trp3i* e *Trp5i*, respectivamente, não cresceram ou cresceram muito pouco na condição de indução do RNA interferente (Galactose), mas todos cresceram em meio repressor (Dextrose). Dentre estes foram escolhidos dois controles (CNU007 e CNU026), um transformante contendo *Trp3i* (CNU031) e outro *Trp5i* (CNU004) para dar continuidade às análises. A Figura 6A mostra uma diluição seriada onde se pode observar o crescimento de *Trp3i* (CNU031) e do controle (CNU026) em meio rico (YEP) nas condições de repressão (dextrose) e indução (galactose) do silenciamento gênico pós-transcricional com e sem a suplementação de triptofano (20 mg/L), nos quais a indução foi feita apenas uma vez e observada nestas placas após 48 a 72 horas. Fica claro que não há diferença de crescimento para o controle, no entanto *Trp3i* (CNU031) apresenta muito pouco crescimento em galactose com ou sem triptofano. A figura 6B mostra os resultados da quantificação da abundância relativa do mRNA de *TRP3* e dos controles nas duas condições de crescimento (Indução e repressão) feitos por PCR em tempo real. Para o controle CNU026 (pIBB103 sem inserto) os níveis de expressão de *TRP3* não apresentam variação significativa entre a condição de repressão (YEPD) e de indução (YEPG). Quando se faz a mesma comparação para *Trp3i* (CNU031), observa-se que não foi possível detectar o transcrito de *TRP3* na condição de indução do silenciamento gênico pós-transcricional (Galactose), no entanto, em repressão (dextrose) os níveis de *TRP3* são comparáveis ao controle (CNU026), portanto, há uma diferença significativa entre as duas condições quando se induz o silenciamento gênico pós-transcricional de *TRP3*, o que é coerente com o padrão de crescimento observado nas diluições seriadas.

Figura 6 - RNAi para o gene *TRP3*. A) Diluição seriada inoculada em placas com YEP com dextrose ou galactose e cada uma com ou sem L-Triptofano (20 mg/L). Da esquerda para a direita, cada inoculo possui 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 e 1 célula. B) PCR em tempo real comparativo entre as expressões de *TRP3* em meio repressor (dextrose) e indutor (galactose) da interferência no controle (CNU026) e em *Trp3i* (CNU031).

A mesma sequência de experimento foi realizada para a linhagem *Trp5i* (CNU004) e o controle (CNU007) e os resultados foram muito semelhantes: o controle cresceu tanto na condição de indução quanto de repressão e a linhagem mutante *Trp5i* (CNU004) cresce normalmente na condição de repressão do silenciamento gênico pós-transcricional de *TRP5* (Dextrose) e na condição de indução ele cresce muito pouco. A Figura 7A mostra o crescimento em diluição seriada e a figura 7B os resultados de PCR em tempo real.

Figura 7 - RNAi para o gene *TRP5*. A) Diluição seriada inoculada em placas com YEP com dextrose ou galactose e cada uma com ou sem L-Triptofano (20 mg/L). Da esquerda para a direita, cada inoculo das placas possui 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 e 1 célula. B) PCR em tempo real comparativo entre as expressões de *TRP5* em meio repressor (dextrose) e indutor (galactose) da interferência no controle (CNU007) e em *Trp5i* (CNU004)

A análise destes resultados nos permitiu aceitar a hipótese formulada inicialmente de que pelo menos 2 genes da via de biossíntese do triptofano, *TRP3* e *TRP5* são essenciais para a

sobrevivência de *C. neoformans* e que a auxotrofia para este aminoácido não pôde ser suplementada com adição de triptofano no meio de cultura.

4.4.2 Efeito da temperatura e da fonte de nitrogênio na assimilação de triptofano durante o silenciamento de *TRP3* e *TRP5*

Há um relato na literatura de que a via de biossíntese da treonina é essencial em *C. neoformans* (KINGSBURY; MCCUSKER, 2008) e que a assimilação deste aminoácido na presença de prolina como fonte única de nitrogênio a temperaturas mais baixas (25 °C) é favorecida. Isso acontece devido ao alívio da repressão catabólica que a fonte preferencial de nitrogênio impõe sobre as vias secundárias de captação de nitrogênio (LJUNGDAHL; DAIGNAN-FORNIER, 2012; MAGASANIK; KAISER, 2002). Tendo isso em vista, o próximo passo foi investigar o comportamento destes mutantes condicionais em meio sintético YNB em condições de indução e repressão do RNAi na presença de sulfato de amônia (fonte preferencial) ou prolina (fonte não preferencial de nitrogênio), com e sem a suplementação de triptofano e nas temperaturas de 30 e 25 °C. A Figura 8 (*TRP3* e *TRP5*) apresenta estes resultados. Os controles CNU007 e CNU026 não apresentam diferenças de crescimento entre os meios indutor e repressor independentemente da fonte de nitrogênio, da presença ou ausência de triptofano e da temperatura. Já os mutantes *Trp3i* e *Trp5i* cresceram em todas as condições de repressão do silenciamento gênico pós-transcricional (dextrose), mas cresceram muito pouco na presença do indutor do mesmo (Galactose) quando a fonte de nitrogênio é preferencial (amônia) com ou sem a adição de triptofano e a despeito da temperatura, como era esperado frente aos resultados com meio rico (YEPG). No entanto, os mutantes (*Trp3i* e *Trp5i*) apresentaram crescimento frente à fonte não preferencial de nitrogênio (prolina) na presença de triptofano. O melhor resultado foi nesta condição à temperatura de 25 °C para o mutante *Trp3i*. O mesmo pode ser observado para *Trp5i* (Figura 8), no entanto, o crescimento foi mais pobre. Vale ressaltar que em YNB + prolina + galactose na ausência de triptofano não houve crescimento, demonstrando que, de fato, esta é a melhor condição para se visualizar o fenótipo da auxotrofia para triptofano.

Figura 8 - RNAi para os genes *TRP3* (*Trp3i*) e *TRP5* (*Trp5i*) e para CNU026. CNU026 é a amostra controle, sendo uma linhagem de *C. neoformans* sorotipo D com o plasmídeo pIBB103 sem inserto. Diluição seriada inoculada em placas com YNB com dextrose ou galactose e cada uma contendo sulfato de amônia ou prolina como fonte de nitrogênio e com ou sem L-Triptofano (20 mg/L). Da esquerda para a direita, cada inoculo das placas possui 10⁴, 10³, 10², 10 e 1 célula.

Esta série de experimentos de silenciamento gênico pós-transcricional mostrou que, de fato, os genes *TRP3* e *TRP5* são essenciais em *C. neoformans* devido à baixa assimilação de triptofano extracelular. A eficiência de assimilação pode ser melhorada pelo uso de temperaturas de crescimento mais baixas e pelo uso da fonte de não preferencial de nitrogênio (prolina).

4.5 Expressão de permeases carreadoras de aminoácidos e dos genes da via de biossíntese do triptofano

A pergunta inicial deste projeto de pesquisa foi plenamente respondida, sendo possível concluir que a via de biossíntese do triptofano é um ótimo alvo para o desenvolvimento de antifúngicos. Os resultados obtidos com a análise desta via metabólica coincidem com aqueles obtidos por Kingsbury e McCusker (2008), em que estes autores detectaram a essencialidade da via de biossíntese da treonina. Estes dois relatos conduzem a uma nova pergunta: por que estes

aminoácidos fornecidos abundantemente no meio de cultura não são capazes de satisfazer estas auxotrofias? Os resultados indicam que a resposta pode estar no mecanismo de repressão catabólica imposto pela fonte preferencial de nitrogênio, uma vez que o uso de prolina permitiu a assimilação dos aminoácidos em ambos os casos, treonina e triptofano. Entre as várias hipóteses que podem ser levantadas na tentativa de se obter uma resposta, as que podem ser mais prontamente formuladas e respondidas, e que também foram sugeridas por Kingsbury e McCusker (2008,) dizem respeito às permeases carreadoras de aminoácidos: Essa classe de permeases pode estar em menor número em *C. neoformans*? Elas podem ter menor afinidade pelo seu substrato, ou ainda, conforme proposto aqui: podem sofrer regulação pela condição nutricional?

Tendo isso em mente, adotou-se uma abordagem *in silico* onde as sequências de aminoácidos das vinte e quatro permeases classificadas como APC (Amino acid-Polyamine-Choline) e as sete permeases vacuolares AAAP (Amino acid/auxin permease) de *S. cerevisiae* (HUNDAL; TAYLOR, 2009; NELISSEN; WACHTER; GOFFEAU, 1997; PAULSEN et al., 1998; WIPF et al., 2002) foram usadas para pesquisar o genoma de *C. neoformans* sorotipo A e assim traçar um panorama da ocorrência destas proteínas neste microrganismo. Os resultados obtidos por BLASTp mostraram que oito e cinco genes de *C. neoformans* codificam proteínas similares as vinte e quatro APCs e as sete AAAPs de *S. cerevisiae*, respectivamente. Este resultado já sugere que, em comparação com *S. cerevisiae*, *C. neoformans* tem um número reduzido de permeases de superfície celular (AAP1 à AAP8), podendo ser esta uma das razões para baixa assimilação de aminoácidos. Ainda, das seis permeases de alta afinidade de *S. cerevisiae* (UGA2, GNP1, MUP1, LYP1, TAT2 e PUT4) somente MUP1 (alta afinidade com metionina) possui homólogos específicos em *C. neoformans*. TAT2 que é o transportador de alta afinidade de triptofano não foi obviamente encontrado no genoma de *C. neoformans*.

Este panorama sugere uma explicação plausível para a essencialidade da via de biossíntese do triptofano em *C. neoformans*. Porém, não há relatos na literatura ou qualquer evidência experimental sobre a funcionalidade destas permeases. O alinhamento de AAP1 a AAP8 mostrou que as mesmas possuem a assinatura característica (PS00218) das permeases de aminoácidos que pode ser encontrada no Prosite Scan (<http://prosite.expasy.org/PS00218>) (Swiss Institute of Bioinformatics, Lousanne, VD, Suíça), no entanto, isso não garante que as mesmas sejam ativas.

Na tentativa de esclarecer o papel destas permeases, foi realizado PCR em tempo real para detectar a abundância relativa da transcrição destes genes (AAP1 a AAP8) em várias condições de

cultivo e para saber se as mesmas são de fato expressas e em que condições nutricionais. Os meios utilizados foram: meio rico (YEPD), e meios sintético (SD, Sintetic Dextrose) com ou sem sulfato de amônia (N) e contendo ou não aminoácidos (AA = Trp, His, Met). O gene constitutivo GPD foi usado como normalizador interno (VARMA; KWON-CHUNG, 1999) e a abundância relativa foi calculada em função do meio rico YEPD. *AAP3* e *AAP7* foram retiradas da análise por não terem apresentado amplificação acima da linha de base, tendo sido consideradas permeases não transcritas nas condições experimentais usadas aqui.

De modo geral, os resultados mostraram que: (i) a troca de meio complexo para meio sintético, independentemente da fonte de nitrogênio e da presença ou ausência de aminoácidos, ativa significativamente ($p < 0,05$) 5 permeases (*AAP2*, 4, 5, 6 e 8). A permease *AAP1* teve baixa indução comparativamente com as outras em todas as condições testadas, tendo sido considerada uma permease de baixa expressão, e a *AAP6* não apresentou variações significativas entre os tratamentos em meio pobre (Figura 9); (ii) a adição de triptofano no meio (SD+N+Trp) foi capaz de induzir de forma modesta, mas significativa ($p < 0,05$) a expressão de *AAP1* e *AAP2* (3,5 e 3,8 vezes, respectivamente), somente na presença da fonte preferencial de nitrogênio (sulfato de amônia) como mostra a Figura 10; (iii) a adição de um conjunto de aminoácidos (triptofano, metionina e histidina) aumentou significativamente a expressão das permeases *AAP2*, 4, 5 e 8, principalmente como fonte única de nitrogênio (SD–N+AA), causando a maior indução, considerando-se todas as condições aqui testadas (Figura 11) ainda (iv) foi possível avaliar que as permeases *AAP2*, 5 e 8 sofrem um nível variável de repressão catabólica. No caso de *AAP8* a repressão parece ser o mecanismo regulatório preponderante, uma vez que a adição de aminoácidos na presença de sulfato de amônia não induz a expressão, como acontece com as permeases *AAP2* e 5, em que há um aumento significativo da expressão quando se adiciona aminoácidos (SD+N+AA) comparativamente a ausência dos mesmos (SD+N-AA). É possível que *AAP2* e 5 tenham dois componentes regulatórios, repressão catabólica e presença de aminoácidos. A permease *AAP4* parece ser regulada unicamente pela presença do “pool” de aminoácidos como substrato, independentemente da presença ou ausência da fonte preferencial de nitrogênio, sugerindo que a mesma não é alvo de repressão catabólica por nitrogênio.

Figura 9 - O gráfico mostra a expressão relativa de 6 possíveis permeases encontradas no genoma de *C. neoformans* e avaliadas quanto ao padrão de expressão por PCR em tempo real. As proporções são relativas ao meio complexo (YEPD). SD = synthetic dextrose, + ou - N = adição ou não de sulfato de amônia como fonte de nitrogênio, + Trp = adição de triptofano, + ou - AA = adição ou não de triptofano, metionina e histidina.

Figura 10 - O gráfico mostra a expressão relativa das permeases AAP1 e AAP2 encontradas no genoma de *C. neoformans* por PCR em tempo real. As proporções são relativas ao meio complexo (YEPD). SD = synthetic dextrose, + ou - N = adição ou não de sulfato de amônia como fonte de nitrogênio, + Trp = adição de triptofano, + ou - AA = adição ou não de triptofano, metionina e histidina.

Uma vez que os aminoácidos triptofano, metionina e histidina foram capazes de induzir a expressão em níveis que o triptofano por si não conseguiu, foram feitas combinação um a um e dois a dois destes aminoácidos e o padrão de expressão das permeases AAP1 a AAP8 foi

determinado. Após a comparação das expressões, verificou-se que, em todos os meios utilizados na indução (SD+N+Trp; SD+N+His; SD+N+Met; SD+N+Trp+His; SD+N+Trp+Met; SD+N+His+Met), nenhuma permease teve destaque quanto aos níveis de expressão, ou seja, nenhum dos aminoácidos sozinho (Trp/His/Met) ou conjunto de dois induziu a expressão das permeases em comparação com todos os três aminoácidos do conjunto, sendo, portanto, inconclusivo.

Figura 11 - O gráfico mostra a expressão relativa das permeases AAP2, 4, 5 e 8 encontradas no genoma de *C. neoformans* por PCR em tempo real. As proporções são relativas ao meio complexo (YEPD). SD = synthetic dextrose, + ou - N = adição ou não de sulfato de amônia como fonte de nitrogênio, + Trp = adição de triptofano, + ou - AA = adição ou não de triptofano, metionina e histidina.

Estes resultados nos encorajaram a verificar o padrão de expressão dos genes da via de biossíntese do triptofano. As mesmas condições experimentais iniciais foram aplicadas e a abundância relativa dos transcritos para *TRP2*, 3, 4 e 5 foi determinada por PCR em tempo real, os resultados podem ser observados na Figura 12. A análise geral dos dados nos mostra que: (i) os 4 genes sofrem uma forte indução durante a privação nutricional (Figura 12); (ii) a adição das diferentes fontes de nitrogênio, bem como a adição de aminoácidos ou apenas de triptofano não causaram flutuações significativas em *TRP2*, 3 e 5, somente *TRP4* teve sua expressão ligeiramente aumentada na presença de triptofano independentemente de ser a fonte única de nitrogênio ou não (dados não mostrados). No entanto, não está clara qual a relevância desta observação.

Quanto à inexistência clara de um padrão de transcrição induzido pela presença de aminoácidos ou de triptofano é esperado uma vez que é conhecido que as enzimas do complexo antranilato sintase sofrem regulação por feedback em *S. cerevisiae*, e portanto, não são necessariamente reguladas transcricionalmente (PRANTL et al., 1985).

Figura 12 - O gráfico mostra a expressão relativa dos 4 genes da via de biossíntese do triptofano por PCR em tempo real. As proporções são relativas ao meio complexo (YEPD). As condições de crescimento são: privação nutricional (SD-N-AA), meio sintético com triptofano como fonte única de nitrogênio (SD-N+Trp), meio sintético com amônia e sem aminoácido (SD+N-AA), meio sintético com amônia e com triptofano (20 mg/mL) (SD+N+Trp), meio sintético com amônia e com aminoácidos (SD+N+AA).

4.6 Inibidores da via de síntese de triptofano

Uma vez que os resultados deste trabalho indicam que a via de síntese de triptofano é essencial, o próximo passo foi testar se os compostos que bloqueiam passos específicos da via são capazes de inibir o crescimento do patógeno. Foram escolhidos compostos que tem registro na literatura como inibidores das enzimas codificadas pelos genes *TRP3* (AS CO II) e *TRP5* (TS). Como inibidor da indol glicerol fosfato sintase (IGPS) utilizou-se o 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON) (CHITTUR et al., 2001) e para inibir a triptofano sintase foi utilizado o N-(3-indolilacetil)-DL-ácido aspártico IAAA, N-(3-indolilacetil)-DL-alanina (IAA) e N-(3-indolilacetil)-DL-valina (IAV) (MARABOTTI; COZZINI; MOZZARELLI, 2000).

Foram feitas avaliações de crescimento por diluição seriada das linhagens de patógenos causadores da criptococcose, *C. neoformans* (sorotipos A e D) e *C. gattii* (sorotipos B e C), em placas de petri contendo meio rico (YEPD) e diferentes concentrações dos inibidores. O inibidor

DON foi testado nas concentrações de 31,25; 62,5; 125 e 250 μ M, os inibidores IAAA e IAA foram utilizados nas concentrações de 6,8; 13,6 e 27,2 mM enquanto que o IAV foi usado nas concentrações de 5,1; 6,8 e 13,6 mM.

O resultado de crescimento das leveduras com os inibidores mostrou que, nas concentrações utilizadas, IAA e IAV não apresentaram inibição significativa. Porém, os inibidores DON e IAAA conseguiram inibir o crescimento das leveduras em placa como podem ser observados nas figuras 13 e 14, respectivamente.

Figura 13 - Teste de crescimento com diluição seriada das linhagens de *C. neoformans* (sorotipo sorotipos A e D) e *C. gattii* (sorotipos B e C) inoculadas em placas com YEPD contendo 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON) em diferentes concentrações. Da esquerda para a direita, cada inoculo das placas possui 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 e 1 células.

Figura 14 - Teste de crescimento com diluição seriada das linhagens de *C. neoformans* (sorotipo sorotipos A e D) e *C. gattii* (sorotipos B e C) inoculadas em placas com YEPD contendo N-(3-indolilacetil)-DL-ácido aspártico (IAAA) em diferentes concentrações. Da esquerda para a direita, cada inoculo das placas possui 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 e 1 célula.

Ambos os experimentos tiveram bons resultados, apesar do crescimento residual das leveduras na concentração de 27,2 mM de IAAA, houve uma crescente inibição dos patógenos, comprovando que, de fato, esses inibidores conseguem ser transportados para o interior das células e atuam na inibição da via deste organismo. O que se pode destacar deste teste está na figura 13, no qual se pode observar que nas concentrações de 125 e 250 μ M de DON há ainda o crescimento,

mesmo que pequeno, de *C. gattii* sorotipo B, que se mostrou mais resistente a esse inibidor em relação aos demais sorotipos. Não se sabe ainda a relevância dessa diferença observada na figura 13, sendo necessários mais estudos com possíveis inibidores da via de síntese de triptofano.

5 DISCUSSÃO

C. neoformans é um patógeno oportunista para o qual há poucas opções de tratamento. A principal causa do pequeno número de antifúngicos é a falta de alvos moleculares validados que possam ser usados para o desenho de novos inibidores com maior toxicidade seletiva. As vias de biossíntese de aminoácidos podem ser alvos promissores, uma vez que várias são essenciais nos seres humanos e representam, portanto, alvos altamente seletivos. A interrupção da biossíntese da metionina, treonina, lisina, isoleucina e valina leva a atenuação da virulência, sugerindo que, compostos que venham a interferir com a atividade catalítica das enzimas que atuam nestas vias podem levar à inibição do crescimento do patógeno *in vivo*. (KINGSBURY et al., 2004a, b; KINGSBURY; MCCUSKER, 2008, 2010a, b, c; PASCON et al., 2004; YANG et al., 2002).

De acordo com os resultados *in silico* obtidos neste trabalho, a organização dos genes da via de biossíntese do triptofano é semelhante àquela descrita por Braus (1991) em *S. cerevisiae*, ainda que algumas diferenças sejam notórias e foram descritas neste trabalho. A organização bifuncional de *TRP5* é a mesma descrita para *S. cerevisiae*, mas a estrutura trifuncional de *TRP3* é diversa daquela encontra em *S. cerevisiae*. Há conservação da estrutura trifuncional entre os zygo, asco e basidiomicetos, sendo que, todos os fungos filamentosos, com exceção de *P. parasítica* apresentam a configuração: NH₂-GAT-IGPS-PRAI-COOH (STAATS et al., 2004). Especificamente dentre os Basiomicetos esta estrutura foi descrita em *Agaricus bisporos*, *Coprinus bilanatus*, *C. cenereus*, *Flammulina velutipes*, *Phanerochaete crysosporium* e *Schizophyllum commune* (CASSELTON; DE LA FUENTE-HERCE, 1989; CHALLEN; ZHANG; ELLIOTT, 2002; MUNOZ-RIVAS et al., 1986; SCHRANK et al., 1991). Outros genes codificam proteínas quiméricas, como é o caso *SPE3-LYS9* (KINGSBURY et al., 2004b), que está envolvido na síntese de lisina e espermidina. Dados não publicados do nosso grupo apontam que *APE4* e *APE1* de *S. cerevisiae* se fusionam em *APE4* de *C. neoformans*, ambos envolvidos no processo de autofagia. De forma geral, apesar desta particularidade a organização da via de biossíntese do triptofano é conservada em *C. neoformans*. Não só os genes são estruturalmente semelhantes, mas a via é funcional, uma vez que a ação inibitória do antimetabólito 5-FAA pode ser detectada, inibindo o crescimento do tipo selvagem.

À semelhança do que acontece com a via de biossíntese da treonina descrita por Kingsbury e McCusker (2008), em *C. neoformans* a via de biossíntese do triptofano é essencial, como mostram nossos dados de RNAi.

É interessante apontar que esta é a segunda via de biossíntese essencial em *C. neoformans*, visto que a da treonina tem as mesmas características (KINGSBURY; MCCUSKER, 2008). Ambas as auxotrofias necessitam de circunstâncias específicas para que a suplementação com o aminoácido adicionado ao meio de cultura tenha efeito; isto é, para ambas as auxotrofias a fonte preferencial de nitrogênio (Amônia) bloqueia a assimilação de aminoácidos, sendo que há necessidade de uma fonte não preferencial (prolina) e temperaturas mais amenas para que haja a suplementação. No caso da treonina, a suplementação só pode ser alcançada pelo uso de dipeptídeos. No caso do triptofano o uso de dipeptídeos não satisfaz a auxotrofia. Outros mutantes auxotróficos de *C. neoformans* são viáveis, mas apresentam sérias deficiência no crescimento, o que pode ser contornado pelo uso da fonte não preferencial de nitrogênio, como é o caso dos mutantes $\Delta ilv2$, $\Delta met6$, $\Delta spe3/lys9$, os quais estão envolvidos na síntese de isoleucina/valina, metionina, espermidina e lisina (KINGSBURY et al., 2004a, b; PASCON et al., 2004). Todos apresentam atenuação da virulência. Em conjunto, estes dados indicam que as mutações em si são deletérias, mas o transporte de aminoácidos que está sujeito à repressão catabólica por amônia contribui muito para a ineficiência na assimilação de aminoácidos em quantidades suficientes para garantir a sobrevivência. Kingsbury e McCusker (2008) discutem que uma possível razão para isso é a existência de um elenco reduzido de permeases ou que estas têm menor afinidade pelo substrato. O fato da assimilação de aminoácidos ocorrer de forma mais eficiente a 25 °C sugere que a(s) permease(s) transportadora(s) de aminoácidos podem ser susceptíveis a alterações conformacionais ditadas pela temperatura. Sendo que, neste caso, é possível que as baixas temperaturas facilitem a associação entre o transportador e o seu substrato aumentando a taxa de assimilação, o que se traduz em maior crescimento da levedura (KINGSBURY et al., 2004a, b; KINGSBURY; MCCUSKER, 2008).

Segundo as nossas análises de bioinformática, *C. neoformans* tem 8 permeases transportadoras de aminoácidos e *S. cerevisiae* tem 24 permeases da família APC, a qual engloba os principais transportadores de aminoácidos globais, de baixa e alta afinidade, amplamente registradas na literatura (PAULSEN et al., 1998). Dentre estas permeases, as pertencentes aos clusters II e III (18 permeases) estão sujeitas à repressão catabólica ou regulação por NCR, as demais são reguladas segundo a disponibilidade de aminoácidos (LJUNGDAHL; DAIGNAN-FORNIER, 2012). Neste trabalho, além de identificar estas 8 permeases no genoma de *C. neoformans*, foi possível traçar um perfil de expressão das mesmas em resposta à condição

nutricional. Nossos dados demonstram que todas são reguladas pela privação nutricional, provavelmente por um mecanismo análogo ao GAAC (LJUNGDAHL; DAIGNAN-FORNIER, 2012). *AAP2* e *5* é provável que sejam reguladas por NCR e pela presença do substrato ou um mecanismo comparável ao SPS-sensing de *S. cerevisiae*. *AAP4* responde a presença de aminoácidos no meio de cultura e *AAP8* por NCR. *AAP6* parece ser induzida em meios sintéticos de modo geral. Ainda, todas sofrem repressão em meio rico, o que explica a inviabilidade dos mutantes de triptofano e treonina nestas condições.

Os dados apresentados sobre o padrão de expressão das permeases e da via de biossíntese do triptofano também contribuem para elucidar alguns processos de regulação metabólica importante, os quais ainda não foram descritos em *C. neoformans*. O sistema de repressão catabólica por nitrogênio (NCR) é conhecido em *C. neoformans* e acontece por meio do fator de transcrição *GAT1* (LEE et al., 2011), entretanto, os seus alvos precisamente ainda não foram identificados. O sistema NCR garante que a fonte preferencial de Nitrogênio é capaz de inibir a exploração de fontes não preferenciais por meio da repressão catabólica. É interessante ressaltar que *GAT1* regula negativamente a expressão de vários fatores de virulência.

A literatura relata que a transcrição das AAPs é regulada pela presença do seu substrato, portanto a disponibilidade de aminoácidos no ambiente extracelular induz a transcrição de genes codificadores de permeases por meio do sistema “SPS-sensing” (DIDION et al., 1998; IRAQUI et al., 1999; KLASSON; FINK; LJUNGDAHL, 1999; LJUNGDAHL, 2009). Dentre todos os elementos deste sistema de sinalização só é clara a presença do transceptor *SSY1* e o fator de transcrição *STP2* no genoma de *C. neoformans*, portanto, não é possível afirmar que este sistema opere neste basidiomiceto.

A assimilação versus a biossíntese de aminoácidos é controlada ainda por mais um mecanismo, a via GAAC (General amino acid control) que dispara uma gama de processos celulares através do fator de transcrição *GCN4* em resposta a privação de aminoácidos. *GCN4p* é capaz de ativar genes que codificam proteínas envolvidas em biossíntese de aminoácidos, precursores dos mesmos, vitaminas, co-fatores, permeases, purinas, peroxissomos, autofagia, vias de resgate de nutrientes, entre outros (LJUNGDAHL; DAIGNAN-FORNIER, 2012).

Retomando a hipótese inicial de que a essencialidade da via de biossíntese se deve à deficiência de permeases em *C. neoformans*, a análise conjunta dos resultados de RNAi, bioinformática, padrão transcricional de permeases e da via de biossíntese do triptofano embasa a

ideia que, de fato, as opções de transportadores de aminoácidos nesta levedura são limitadas e isso acarretaria em um sistema de assimilação ineficiente. Este fato coloca um grande peso sobre a via de biossíntese, a qual assume um papel central como a melhor forma de garantir a demanda celular de triptofano. Os níveis de expressão pouco regulados em função de variações do ambiente garantiriam o suprimento de um aminoácido essencial de forma relativamente independente da variação ambiental, e, por conseguinte, a sobrevivência da levedura em condições diversas.

No que se refere à via de biossíntese do triptofano esta foi validada com sucesso neste trabalho e considerada um excelente alvo para o desenvolvimento de novos antifúngicos.

Ao testar possíveis inibidores da via de síntese de triptofano, foram obtidos bons resultados com os dois inibidores, o DON para inibir *TRP3* e N-(3-indolilacetil)-DL-ácido aspártico (IAAA), inibidor de *TRP5*, tendo ambos inibição crescente com o aumento da concentração. Observou-se que nas concentrações de 125 e 250 μM de DON há ainda um crescimento residual em *C. gattii* sorotipo B, que se mostrou mais resistência a esse inibidor em relação aos demais sorotipos. Ambas as substâncias fizeram seu papel de inibir o crescimento dos patógenos, dando destaque maior ao DON pelas quantidades muito menores que foram necessárias (na ordem de μM) para um mesmo nível de inibição provocado pelo N-(3-indolilacetil)-DL-ácido aspártico, sendo, portanto ótimos protótipos de estudo.

6 CONCLUSÃO

Ao se estudar a via de biossíntese de triptofano em *C. neoformans*, verificou-se que esta é essencial ao patógeno, uma vez que ele não consegue sobreviver apenas com a assimilação de aminoácido do meio ambiente, sendo esta via então um ótimo alvo para o desenvolvimento de novos antifúngicos.

Uma possível razão para essa letalidade é devida a existência de uma quantidade reduzida de permeases funcionais nesse organismo (6) quando comparado com as permeases de *S. cerevisiae* e/ou que estas têm menor afinidade pelo substrato, havendo uma necessidade muito grande do uso da via de biossíntese de triptofano e possivelmente de outros aminoácidos também.

Em suma, a via de biossíntese de triptofano em *C. neoformans* é essencial e pode ser considerada um ótimo alvo para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos, dentre as quais os inibidores IAAA e o DON podem ser testados e melhor estudados para essa finalidade.

REFERÊNCIAS¹

- ALSPAUGH, J. A.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and cAMP. **Genes Dev.**, v. 11, p. 3206-3217, 1997.
- ALSPAUGH, J. A.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. Signal transduction pathways regulating differentiation and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 25, p. 1-14, 1998.
- ALSPAUGH, J. A.; DAVIDSON, R. C.; HEITMAN, J. Morphogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Contrib. Microbiol.**, v. 5, p. 217-238, 2000.
- ALSPAUGH, J. A. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal Genet. Biol.**, 2014. In press.
- AMADASI, A. ; BERTOLDI, M. ; CONTESTABILE, R.; BETTANI S. ; CELLINI, B.; DI SALVO, M. L.; BORRI-VOLTATTORNI, C.; BOSSA F.; MOZZARELLI, A. Pyridoxal 50-phosphate enzymes as targets for therapeutic agents. **Curr. Med. Chem.**, v. 14, p. 1291–1324, 2007.
- ANDES, D. Optimizing antifungal choice and administration. **Curr. Med. Res. Opin.**, v. 29, p. 13-18, 2013.
- BILLMYRE, R. B.; CALO, S.; FERETZAKI, M.; WANG, X.; HEITMAN, J. RNAi function, diversity, and loss in the fungal kingdom. **Chromosome Res.**, DOI 10.1007/s10577-013-9388-2, 2013.
- BOTTS, M. R.; HULL, C. M. Dueling in the lung: how *Cryptococcus* spores race the host for survival. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 13, p. 437-442, 2010.
- BRAUS, G. H. Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway. **Microbiol. Rev.**, v. 55, p. 349-370, 1991.
- BROWN, S. M.; CAMPBELL, L. T.; LODGE, J. K.; *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 10, p. 320-325, 2007.
- BROWN, J. C. S.; MADHANI, H. D. Approaching the functional annotation of fungal virulence factors using cross-species genetic interaction profiling. **PLoS Genet.**, v. 8, e1003168 doi:10.1371/journal.pgen.1003168, 2012.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- CAMMACK, R. et al. **Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology**. New York, United States: Oxford University Press, 1997. 43 p. ISBN 0-19-854768-4.
- CASSELTON, L. A.; DE LA FUENTE-HERCE, A. Heterologous gene expression in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. **Curr. Genet.**, v. 16, p. 35-40, 1989.
- CHALLEN, M. P.; ZHANG, C.; ELLIOTT, T. J. *Agaricus bisporus* and *Coprinus bilanatus* TRP2 genes are tri-functional with conserved intron and domain organisations. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 208, p. 269-274, 2002.
- CHITTUR, S. V.; KLEM, T. J.; SHAFER, C. M.; JO DAVISSON, V. J. Mechanism for acivicin inactivation of triad glutamine amidotransferases. **Biochemistry**, v. 40, p. 876-887, 2001.
- COX, G. M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G. T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 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.**, v. 39, p. 166-175, 2001.
- CRUZ, M. C.; FOX, D. S.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. **EMBO J.**, v. 20, p. 1020-1032, 2001.
- DANG, Y.; YANG, Q. ; XUE, Z. ; LIU, Y. RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. **Eukaryot. Cell**, v. 10, p. 1148-115, 2001.
- DAVIDSON, R. C.; BLANKENSHIP, J. R.; KRAUS, P. R.; BERRIOS, M. J.; HULL, C. M.; D'SOUZA, C.; WANG, P.; HEITMAN, J. A PCR-based strategy to generate integrative targeting alleles with large regions of homology. **Microbiology**, v. 148, p. 2607-2615, 2002.
- DETTWILER, M.; KIRSCHNER, K. Tryptophan synthase from *Saccharomyces cerevisiae* is a dimer of two polypeptide chains of Mr 76000 each. **Eur. J. Biochem.** v. 102, p. 159-165, 1979.
- DIDION, T.; REGENBERG, B.; JORGENSEN, M. U.; KIELLAND-BRANDT, M. C.; ANDERSEN, H. A. The permease homologue Ssy1p controls the expression of amino acid and peptide transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Microbiol.**, v. 27, p. 643-650, 1998.
- DING, C.; IN, J.; TOVAR, E. M. M.; FITZPATRICK, D. A.; HIGGINS, D. G.; THIELE, D. J. The copper regulon of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Mol. Microbiol.**, v. 81, p. 1560-1576, 2011.
- DOERING, T. L. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 63, p. 223-247, 2009.
- DOGINI, D. B.; PASCOAL, V. D. B.; AVANSINI, S. H.; VIEIRA, A. S; PEREIRA T. C.; LOPES-CENDES, I. The new world of RNAs. **Genet. Mol. Biol.**, v. 37, p. 285-293, 2014.

DROUX, M.; LEBRUN, M. **The use of methionine synthase inhibitors for the treatment of fungal diseases of crops.** EU n° 7955828. 7 jun. 2011; United States Patent Office: Bayer Cropscience AG p. 1-29, 2011.

DUNCAN, C.; SCHWANTJE, H.; STEPHEN, C.; CAMPBELL, J.; BARTLETT, K. *Cryptococcus gattii* in wildlife of Vancouver Island, British Columbia, Canada. **J. Wildl. Dis.**, v. 42, p. 175-178, 2006.

DUNN, M. F.; AGULAR, V.; DREWE, W. F. JR.; HOUBEN, K.; ROBUSTELL, B.; ROY, M. The interconversion of *E. coli* tryptophan synthase intermediates is modulated by allosteric interactions. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 24, p. 44-51, 1987.

DYKXHOORN, D. M.; NOVINA, C. D.; SHARP, P. A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 4, p. 457-467, 2003.

EVANS, E. E. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. **J. Immunol.**, v. 64, p. 423-430, 1950.

FAN, W.; KRAUS, P. R.; BOILY, J.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. **Eukaryot. Cell**, v. 4, p. 1420-1433, 2005.

FELDMESSER, M.; TUCKER, S.; CASADEVALL, A. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol.**, v. 9, p. 273-278, 2001.

FOX, D. S.; HEITMAN, J. Good fungi gone bad: the corruption of calcineurin. **Bioessays**, v. 24, p. 894-903, 2002.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 838-840, 1999.

GANENDREN, R.; CARTER, E.; SORRELL, T.; WIDMER, F.; WRIGHT, L. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. **Microbes Infect.**, v. 8, p. 1006-1015, 2006.

GUEDES, R. L. M.; PROSDOCIMI, F.; FERNANDES, G. R.; MOURA, L. K.; RIBEIRO, H. A. L.; ORTEGA, J. M. Amino acids biosynthesis and nitrogen assimilation pathways: a great genomic deletion during eukaryotes evolution. **BMC Genomics**, v. 12, p. 1-13, 2011.

GUERRERO, A.; FRIES, B. C. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* contributes to virulence by changing the immunological host response. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 4322-4331, 2008.

HEITMAN, J. Microbial pathogens in the fungal kingdom. **Fungal Biol. Rev.**, v. 25, p. 48-60, 2011.

HEMENWAY, C. S.; HEITMAN, J. Calcineurin. Structure, function, and inhibition. **Cell Biochem. Biophys.**, v. 30, p. 115-151, 1999.

HERRMANN, K. M The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. **Plant Physiol.**, v. 107, p. 7-12, 1995.

HOLE, C. R.; WORMLEY JR., F. L. Vaccine and immunotherapeutic approaches for the prevention of cryptococcosis: lessons learned from animal models. **Front Microbiol.**, v. 3, p. 1-7, 2012.

HU, G.; CHENG, P.; SHAM, A.; PERFECT, J. R.; KRONSTAD, J. W. Metabolic adaptation in *Cryptococcus neoformans* during early murine pulmonary infection. **Mol. Microbiol.**, v. 69, p. 1456-1475, 2008.

HUA, J.; MEYER, J. D.; LODGE, J. K. Development of positive selectable markers for the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 7, p. 125-128, 2000.

HUANG, X; HOLDEN, H. M.; RAUSHEL, F. M. Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 70, p. 149-80, 2001.

HULL, C. M.; HEITMAN, H. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. **Annu. Rev. Genet.**, v. 36, p. 557-615, 2002.

HUNDAL, H. S.; TAYLOR P. M. Amino acid transceptors: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 296, p. E603-613, 2009. doi: 10.1152/ajpendo.91002.2008.

HÜTTER, R.; NIEDERBERGER, P.; DEMOSS, J. A. Tryptophan biosynthetic genes in eukaryotic microorganisms. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 40, p. 55-77, 1986.

IRAQUI, I.; VISSERS, S.; BERNARD, F.; CRAENE, J. O.; BOLES, E. Amino acid signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: a permease-like sensor of external amino acids and F-Box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the AGP1 gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease. **Mol. Cell Biol.**, v. 19, p. 989-1001, 1999.

JANBON, G. *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. **FEMS Yeast Res.**, v. 4, p. 765-771, 2004.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochim. Pol.**, v. 56, p. 211-224, 2009.

KAVANAGH, K. Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. In:_____. **New insights in medical mycology**. New York, United States: Springer, 2007. p. 131-157. ISBN 978-1-4020-6397-8.

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**, v. 150, p. 1547-1558, 2004a.

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**, v. 3, p. 752-763, 2004b.

KINGSBURY, J. M.; MCCUSKER, J. H. Threonine biosynthetic genes are essential in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 154, p. 2767-2775, 2008.

KINGSBURY, J. M.; MCCUSKER, J. H. Cytocidal amino acid starvation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* acetolactate synthase (*ilv2D*) mutants is influenced by the carbon source and rapamycin **Microbiology**, v. 156, p. 929-939, 2010a.

KINGSBURY, J. M.; MCCUSKER, J. H. Homoserine toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* homoserine kinase (*thr1Δ*) mutants. **Eukaryot. Cell**, v. 9, p. 717-728, 2010b.

KINGSBURY, J. M.; MCCUSKER, J. H. Fungal homoserine kinase (*thr1Δ*) mutants are attenuated in virulence and die rapidly upon threonine starvation and serum incubation. **Eukaryot. Cell**, v. 9, p. 729-737, 2010c.

KISHORE, G. M.; SHAH, D. M. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 57, p. 627-663, 1988.

KLASSON, H.; FINK, G. R.; LJUNGDAHL, P. O. Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. **Mol. Cell Biol.**, v. 19, p. 5405-5416, 1999.

KMETZSCH, L.; STAATS, C. C.; SIMON, E.; FONSECA, F. L.; OLIVEIRA, D. L. The GATA-type transcriptional activator Gat1 regulates nitrogen uptake and metabolism in the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 48, p. 192-199, 2011.

KRETSCHMER, M.; REINER, E.; HU, G.; TAM, N.; OLIVEIRA, D. L.; CAZA, M.; YEON, J. H.; KIM, J.; KASTRUP, C. J.; JUNG, W. H.; KRONSTAD, J. W. Defects in phosphate acquisition and storage influence virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 82, p. 2697-2712, 2014.

KRONSTAD, J.; SAIKIA, J.; NIELSON, E. D.; KRETSCHMER, M.; JUNG, W.; HU, G.; GEDDES, J. M. H.; GRIFFITHS, E. J.; CHOI, J.; CADIEUX, B.; CAZA, M.; ATTARIAN, R. Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to mammalian hosts: integrated regulation of metabolism and virulence. **Eukaryot. Cell**, v. 11, p. 109-118, 2011.

KRONSTAD, J. W.; HU, G.; JUNG, W. H. An encapsulation of iron homeostasis and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol.**, v. 21, p. 457-465, 2013.

- KWON-CHUNG, K. J. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia**, v. 67, p. 1197-1200, 1975.
- KWON-CHUNG, K. J. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. **Mycologia**, v. 68, p. 943-946, 1976.
- KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Distribution of alpha and alpha mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. **Am. J. Epidemiol.**, v. 108, p. 337-340, 1978.
- KWON-CHUNG, K. J.; EDMAN, J. C.; WICKES, B. L. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 602-605, 1992.
- LAROSSA, R. A.; SCHLOSS, J. V. The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 8753-8757, 1984.
- LEE, I. R.; CHOW, E. W. L.; MORROW, C. A.; DJORDJEVIC, J. T.; FRASER, J. A. Nitrogen metabolite repression of metabolism and virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Genetics**, v. 188, p. 309-323, 2011.
- LENGELER, K. B.; FOX, D. S.; FRASER, J. A.; ALLEN, A.; FORRESTER, K.; DIETRICH, F. S.; HEITMAN, J. Mating-type *locus* of *Cryptococcus neoformans*: a step in the evolution of sex chromosomes. **Eukaryot. Cell**, v. 1, p. 704-718, 2002.
- LI, S. S.; MODY, C. H. *Cryptococcus*. **Proc. Am. Thorac. Soc.**, v. 7, p. 186-196, 2010.
- LIAO, Y.; CHEN, M.; HARTMANN, T.; YANG, R.; LIAO, W. Epidemiology of opportunistic invasive fungal infections in china: review of literature. **Chin. Med. J. (Engl)**, v. 126, p. 361-368, 2013.
- LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 60, p. 69-105, 2006.
- LIPARDI, C.; WEI, Q.; PATERSON, B. M. RNAi as random degradative PCR. siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. **Cell**, v. 107, p. 297-307, 2001.
- LIU, O. W.; CHUN, C. D.; CHOW, E. D.; CHEN, C.; MADHANI, H. D.; NOBLE, S. M. Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Cell**, v. 135, p. 174-188, 2008.
- LIU, T. B.; PERLIN, D. S.; XUE, C. Molecular mechanisms of *Cryptococcal meningitis*. **Virulence**, v. 3, p. 173-181, 2012.
- LJUNGDAHL, P. O. Amino-acid-induced signalling via the SPS-sensing pathway in yeast. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 37, p. 242-247, 2009.

LJUNGDAHL, P. O.; DAIGNAN-FORNIER, B. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 190, p. 885-929, 2012.

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 and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Science**, v. 307, p. 1321-1324, 2005.

MAGASANIK, B.; KAISER C. A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 290, p. 1-18, 2002.

MARABOTTI, A.; COZZINI P.; MOZZARELLI A. Novel allosteric effectors of the tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ complex identified by computer-assisted molecular modeling. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1476, p. 287-299, 2000.

MAURER, R.; CRAWFORD, I. P. Tryptophan synthetase 2 subunit. Primary structure of the pyridoxyl peptide from the *Pseudomonas putida* enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 246, p. 6625-6630, 1971.

MCDADE, H. C.; COX, G. M. A new dominant selectable marker for use in *Cryptococcus neoformans*. **Med. Mycol.**, v. 39, p. 151-154, 2001.

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. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Med. Mycol.**, v. 47, p. 561-570, 2009.

MORYA, V. K.; KUMARI, S.; KIM, E. Imperative pathway analysis to identify the potential drug target for Aspergillus infection. **International Journal of Latest Trends in Computing**, v. 2, p. 178-182, 2011.

MUNOZ-RIVAS, A.; SPECHT, C. A.; DRUMMOND, B. J.; FROELIGER, E.; NOVOTNY, C. P.; ULLRICH, R. C. Transformation of the basidiomycete, *Schizophyllum commune*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 205, p. 103-106, 1986.

NELISSEN, B.; WACHTER, R.; GOFFEAU, A. Classification of all putative permeases and other membrane plurispansers of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 21, p. 113-134, 1997.

- 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.**, v. 71, p. 4831-4841, 2003.
- NOSANCHUK, J. D.; OVALLE, R.; CASADEVALL, A. Glyphosate inhibits melanization of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. **J. Infect. Dis.**, v. 183, 1093-1099, 2001.
- NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. **Microbiology**, v. 149, p. 1945-1951, 2003.
- ODOM, A.; MUIR, S.; LIM, E.; TOFFALETTI, D. L.; PERFECT, J.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **EMBO J.**, v. 16, p. 2576-2589, 1997.
- O'MEARA, T. R.; ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 25, p. 387-408, 2012.
- ORY, J. J.; GRIFFITH, C. L.; DOERING, T. L. An efficiently regulated promoter system for *Cryptococcus neoformans* utilizing the *CTR4* promoter. **Yeast**, v. 21, p. 919-926, 2004.
- OSTROSKY-ZEICHNER, L.; CASADEVALL, A.; GALGIANI, J. N.; ODDS, F. C.; REX, J. H. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 9, p. 719-727, 2010.
- PARK, B. J.; WANNEMUEHLER, K. A.; MARSTON, B. J.; GOVENDER, N.; PAPPAS, P. G.; CHILLER, T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, p. 525-530, 2009.
- PAIVA, J. A.; PEREIRA, J. M. New antifungal antibiotics. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 26, p. 168-174, 2013.
- PASCON, R. C.; GANOUS, T. M.; KINGSBURY, J. M.; COX, G. M.; MCCUSKER, J. H. *Cryptococcus neoformans* methionine synthase: expression analysis and requirement for virulence. **Microbiology**, v. 150, p. 3013-3023, 2004.
- PAULSEN, I. T.; SLIWINSKI, M. K.; SAIER, M. H. JR. Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. **J. Mol. Biol.**, v. 277, p. 573-592, 1998.
- PAYNE, R. J.; BULLOCH, E. M.; ABELL, A. D.; ABELL, C. Design and synthesis of aromatic inhibitors of anthranilate synthase. **Org. Biomol. Chem.**, v. 3, p. 3629-3635, 2005.
- PAYNE, R. J.; BULLOCH, E. M.; TOSCANO, M. M.; JONES, M. A.; KERBARH, O.; ABELL, C. Synthesis and evaluation of 2,5-dihydrochorismate analogues as inhibitors of the chorismate-utilising enzymes. **Org. Biomol. Chem.**, v. 7, p. 2421-2429, 2009.

PAYNE, R. J.; BULLOCH, E. M. M.; KERBARH, O.; ABELL, C. Inhibition of chorismate-utilising enzymes by 2-amino-4-carboxypyridine and 4-carboxypyridone and 5-carboxypyridone analogues. **Org. Biomol. Chem.**, v. 8, p. 3534-3542, 2010.

PERFECT, J. R.; RUDE, T. H.; PENNING, L. M.; JOHNSON, S. A. Cloning the *Cryptococcus neoformans* *TRP1* gene by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 122, p. 213-217, 1992.

PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 16, p. 837-874, 2002.

PERFECT, J. R.; DISMUKES, W. E.; DROMER, F.; GOLDMAN, D. L.; GRAYBILL, J. R.; HAMILL, R. J.; HARRISON, T. S.; LARSEN, R. A.; LORTHOLARY, O.; NGUYEN, M.; PAPPAS, P. G.; POWDERLY, W. G.; SINGH, N.; SOBEL J. D.; SORRELL, T. C. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society Of America. **Clin. Infect. Dis.**, v. 50, p. 291-322, 2010.

POUND, M. W.; TOWNSEND, M. L.; DIMONDI, V.; WILSON D.; DREW, R. H. Overview of treatment options for invasive fungal infections. **Med. Mycol.**, v. 49, p. 561-580, 2011.

POWDERLY, W. G. Cryptococcal meningitis and AIDS. **Clin. Infect. Dis.**, v. 17, p. 837-842, 1993.

PRANTL, F.; STRASSER, A.; AEBI, M.; FURTER, R.; NIEDERBERGER, P. Purification and characterization of the indole-3-glycerolphosphate synthase/anthranilate synthase complex of *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 146, p. 95-100, 1985.

QAZZAFI, Z.; THIRUCHUNAPALLI, D.; BIRKENHEAD, D.; BELL, D.; SANDOE, J. A. Invasive *Cryptococcus neoformans* infection in an asplenic patient. **J. Infect.**, v. 55, p. 566-568, 2007.

RABONI, S.; BETTATI, S.; MOZZARELLI A. Tryptophan synthase: a mine for enzymologists. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 66, p. 2391-2403, 2009.

ROMAN, E.; ARANA, D. M.; NOMBELA, C.; ALONSO-MONGE, R.; PLA, J. MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. **Trends Microbiol.**, v. 15, p. 181-190, 2007.

ROY, M.; KEBLAWI, S.; DUNN, M. F. Stereoelectronic control of bond formation in *Escherichia coli* tryptophan synthase: substrate specificity and enzymatic synthesis of the novel amino acid dihydroisotryptophan. **Biochemistry**, v. 6, p. 6698-6704, 1988.

SAAG, M. S.; GRAYBILL, R. J.; LARSEN, R. A.; PAPPAS, P. G.; PERFECT, J. R.; POWDERLY, W. G.; SOBEL, J. D.; DISMUKES, W. E. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 710-718, 2000.

SALAME, T. M.; ZIV, C.; HADAR, Y.; YARDEN, O. RNAi as a potential tool for biotechnological applications in fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 89, p. 501-512, 2011.

SCHRANK, A.; TEMPELAARS, C.; SIMS, P. F.; OLIVER, S.G.; BRODA, P. The *trpC* gene of *Phanerochaete chrysosporium* is unique in containing an intron but nevertheless maintains the order of functional domains seen in other fungi. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 467-476, 1991.

SHEN, H.; WANG, F.; ZHANG, Y.; HUANG, Q.; XU, S.; HU, H.; YUE, J.; WANG, H. A novel inhibitor of indole-3-glycerol phosphate synthase with activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **FEBS J.**, v. 276, p. 144-154, 2009.

SHEN, H.; YANG, E.; WANG, F.; JIN, R.; XU, S.; HUANG, Q.; WANG, H. Altered protein expression patterns of *Mycobacterium tuberculosis* induced by ATB107. **J. Microbiol.**, v. 48, p. 337-346, 2010.

SIDRIM, J. J.; COSTA, A. K.; CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S.; MOURA, F. E.; CASTELO-BRANCO, D. S.; NETO, M. P.; ROCHA, M. F. Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review. **Can. J. Microbiol.**, v. 56, p. 445-458, 2010.

SINGH, A.; PANTING, R. J.; VARMA, A.; SAIJO, T.; WALDRON, K. J.; JONG, A.; NGAMSKULRUNGROJ, P.; CHANG, Y. C.; RUTHERFORD, J. C.; KWON-CHUNG, K. J. Factors Required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. **MBio**, v. 4, e00220-13, 2013.

SKOWYRA, M. L.; DOERING, T. L. RNA Interference in *Cryptococcus neoformans*. **Methods Mol. Biol.**, v. 845, p. 165-186, 2012.

STAATS, C. C.; SILVA, M. S.; PINTO, P. M.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. The *Metarhizium anisopliae* *TRP1* gene: cloning and regulatory analysis. **Curr. Microbiol.**, v. 49, p. 66-70, 2004.

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.**, v. 175, p. 1405-1411, 1993.

TOYN, J. H.; GUNYUZLU, P. L.; WHITE, W. H.; THOMPSON, L. A.; HOLLIS, G. F. A counterselection for the tryptophan pathway in yeast: 5-fluoroanthranilic acid resistance. **Yeast**, v. 16, p. 553-560, 2000.

UPADHYA, R.; CAMPBELL, L. T.; DONLIN, M. J.; AURORA, R.; LODGE, J. K. Global transcriptome profile of *Cryptococcus neoformans* during exposure to hydrogen peroxide induced oxidative stress. **PLoS ONE**, v. 8, e55110, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0055110.

VALLIM, M. A.; NICHOLS, C. B.; FERNANDES, L.; CRAMER, K. L.; ALSPAUGH, J. A. A Rac homolog functions downstream of Ras1 to control hyphal differentiation and high-temperature growth in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot. Cell**, v. 4, p. 1066-1078, 2005.

VAN DER HORST, C. M.; SAAG, M. S.; CLOUD, G. A.; HAMILL, R. J.; GRAYBILL, J. R.; SOBEL, J. D.; JOHNSON, P. C.; TUAZON, C. U.; KERKERING, T.; MOSKOVITZ, B. L.; POWDERLY, W. G.; DISMUKES, W. E. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group and AIDS Clinical Trials Group. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, p. 15-21, 1997.

VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Characterization of the Glyceraldehyde-3-phosphate gene and the use of its promoter for heterologous expression in *Cryptococcus neoformans*, a human pathogen. **Gene**, v. 237, p. 155-163, 1999.

WANG, P.; HEITMAN, J. Signal transduction cascades regulating mating, filamentation, and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 2, p. 358-362, 1999.

WANG, X.; HSUEH, Y.; LI, W.; FLOYD, A.; SKALSKY, R.; HEIRMAN, J. Sex-induced silencing defends the genome of *Cryptococcus neoformans* via RNAi. **Genes Dev.**, v. 24, p. 2566-2582, 2010.

WATERMAN, S. R.; HACHAM, M.; PANEPINTO, J.; HU, G.; SHIN, S.; WILLIAMSON, P. R. Cell wall targeting of laccase of *Cryptococcus neoformans* during infection of mice. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 714-722, 2007.

WEERDEN, N. L.; BLEACKLEY, M. R.; ANDERSON, M. A. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 70, p. 3545-3570, 2013.

WICKES, B. L.; EDMAN, J. C. The *Cryptococcus neoformans* *GAL7* gene and its use as an inducible promoter. **Mol. Microbiol.**, v. 16, p. 1099-1109, 1995.

WILBUR, L.; HEYBORNE, R. Transient loss of consciousness caused by cryptococcal meningitis in an immunocompetent patient: a case report. **Cases J.**, v. 2, p. 60, 2009.

WIPF, D.; LUDEWIG, U.; TEGEDER, M.; RENTSCH, D.; KOCH, W.; FROMMER, W. B. Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. **TRENDS Biochem. Sci.**, v. 27, p. 139-147, 2002.

YAMAKI, H.; YAMAGUCHI, M.; TSURUO, T.; YAMAGUCHI, H. Mechanism of action of an antifungal antibiotic, RI-331, (S) 2-amino-4-oxo-5-hydroxypentanoic acid; kinetics of inactivation of homoserine dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Antibiot. (Tokyo)**, v. 45, p. 750-755, 1992.

YANG, Z.; PASCON, R. C.; ALSPAUGH, A.; COX, G. M.; MCCUSKER, J. H. Molecular and genetic analysis of the *Cryptococcus neoformans* *MET3* gene and a met3 mutant. **Microbiology**, v. 148, p. 2617-2625, 2002.

ZIEBART, K. T.; DIXON, S. M.; AVILA, B.; EL-BADRI, M. H.; GUGGENHEIM, K. G.; KURTH, M. J.; TONEY, M. D. Targeting multiple chorismate-utilizing enzymes with a single inhibitor: validation of a three-stage design. **J. Med. Chem.**, v. 53, p. 3718-3729, 2010.

ZURAWSKI, G.; ELSEVIERS, D.; STAUFFER, G. V.; YANOFSKY, C. Translational control of transcription termination at the attenuator of the *Escherichia coli* tryptophan operon. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 75, p. 5988-5992, 1978.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Lista de oligonucleotídeos usados neste trabalho.

Nome	Sequência (5' - 3')	Uso
PRCP100	GTTTCTAAGTCTACGTATACATGA	Construção do Cassete de Deleção de <i>TRP3</i> em H99
PRCP101	CTCCAGCTCACATCCTCGCATTGATTTTCTCGGCTGTACCGA	Construção do Cassete de Deleção de <i>TRP3</i> em H99
PRCP102	TCGGTACAGCCGAGGAAAAATCAAATGCGAGGATGTGAGCTGGAG	Construção do Cassete de Deleção de <i>TRP3</i> em H99
PRCP103	ATATACACCCTCTAAGGAAAAGAAGAGATGTAGAACTAGCTTCC	Construção do Cassete de Deleção de <i>TRP3</i> em H99
PRCP104	GGAAGCTAGTTTCTACATCTCTTCTTTTCCTTAGAGGGTGATAT	Construção do Cassete de Deleção de <i>TRP3</i> em H99
PRCP105	TAACACACATCATCACGCTCTTGC	Construção do Cassete de Deleção de <i>TRP3</i> em H99
PRCP106	ATTAGGGCAAGATGTTTTGGG	Confirmatório do Cassete de Deleção de <i>TRP3</i> em H99
PRCP107	GAACACCGCAGCTCCCACTCC	Confirmatório do Cassete de Deleção de <i>TRP3</i> em H99
PRCP108	GGGGGGCGCGTCTGTCTGCGAGG	Construção do Cassete de Deleção de <i>TRP5</i> em H99
PRCP109	TCTCCAGTCCATCCTCGCAGAAAGGAGAGATGAGATGGGATACAAAC	Construção do Cassete de Deleção de <i>TRP5</i> em H99
PRCP110	GTTTGTATCCCATCTCATCTCTCTTCTGCGAGGATGTGAGCTGGAGA	Construção do Cassete de Deleção de <i>TRP5</i> em H99
PRCP111	CTGCACATGCATATTCGATGCCTGAAGAGATGTAGAACTAGCTTCC	Construção do Cassete de Deleção de <i>TRP5</i> em H99
PRCP112	GGAAGCTAGTTTCTACATCTCTTCAGGCATCGAATATGCATGTGCAG	Construção do Cassete de Deleção de <i>TRP5</i> em H99
PRCP113	CCAGCCCTCACGTTCTCCCCCTTC	Construção do Cassete de Deleção de <i>TRP5</i> em H99
PRCP114	GAAGAGACTGCCGGATGCG	Confirmatório do Cassete de Deleção de <i>TRP5</i> em H99
PRCP115	CCACAGTCCACACCCCTC	Confirmatório do Cassete de Deleção de <i>TRP5</i> em H99
PRCP134	TTGTTGAGGAATGCGGACATG	Construção do Cassete de Deleção de <i>TRP5</i> em H99
PRCP135	CCATCTTTTCAACTTTCACC	Construção do Cassete de Deleção de <i>TRP5</i> em H99
PRCP137	CTCCAGTCCATCCTCGCATGTGCTGGATGTGGATGAGGAGAGACGA	Construção do Cassete de Deleção de <i>TRP5</i> em JEC21
PRCP138	TCGTCTCTCCTCATCCACATCCAGCACATGCGAGGATGTGAGCTGGAG	Construção do Cassete de Deleção de <i>TRP5</i> em JEC21
PRCP139	GATAGCGTATACTACATGCAGCTGAAGAGATGTAGAACTAGCTTCC	Construção do Cassete de Deleção de <i>TRP5</i> em JEC21
PRCP140	GGAAGCTAGTTTCTACATCTCTTCAGCTGCATGTAGTATACGCTATC	Construção do Cassete de Deleção de <i>TRP5</i> em JEC21
PRCP147	gctacaactagtGGTGTCTCTAGGGACGTGATCG	RNAi de <i>TRP3</i> em JEC21, contendo sítio de restrição SpeI
PRCP148	gctacaactagtGGAAGCGACTGAATTTGGGCGG	RNAi de <i>TRP3</i> em JEC21, contendo sítio de restrição SpeI
PRCP153	gctacaactagtAGGATCCGAGTGAAGACTGG	RNAi de <i>TRP5</i> em JEC21, contendo sítio de restrição SpeI
PRCP154	gctacaactagtTAGTCGAGACCGGCAGAGATG	RNAi de <i>TRP5</i> em JEC21, contendo sítio de restrição SpeI
PRCP155	gctacaTAAACTCCCTTCTCGATTTCGG	RNAi 2 de <i>TRP5</i> em JEC21, contendo sítio de restrição SpeI
PRCP156	gctacaactagtATGCCAAACTTGGCGCAGAC	RNAi 2 de <i>TRP5</i> em JEC21, contendo sítio de restrição SpeI
PRCP157	AATCAAAGGAAGGCCAGCTCAC	PCR em Tempo Real de <i>TRP5</i> em H99
PRCP158	CACTCAAACAGATGACGATATCC	PCR em Tempo Real de <i>TRP5</i> em H99
PRCP159	CGGTGAGAGATCGCTTATGC	PCR em Tempo Real de <i>TRP3</i> em H99
PRCP160	CCTTCACTCATGCAACTCTCAG	PCR em Tempo Real de <i>TRP3</i> em H99
PRCP161	gctacaactagtTGCTTCTCCCTCCAAGGGC	RNAi 2 de <i>TRP3</i> em JEC21, contendo sítio de restrição SpeI
PRCP162	gctacaactagtCGGTTGTTAACACCAATGACC	RNAi 2 de <i>TRP3</i> em JEC21, contendo sítio de restrição SpeI
PRCP165	AGTATGACTCCACACATGGTCG	PCR em Tempo Real de <i>GPDH</i> em JEC21
PRCP166	AGACAAACATAGAGCATCAGC	PCR em Tempo Real de <i>GPDH</i> em JEC21
PRCP185	GCCTTATGGTATACTCTATGATG	PCR em Tempo Real de <i>AAP1</i> em H99
PRCP186	CCGTATGCCCGAGCACCGAGG	PCR em Tempo Real de <i>AAP1</i> em H99
PRCP187	CATGGTATACGCGATGATGG	PCR em Tempo Real de <i>AAP2</i> em H99
PRCP188	TCTGGCTCCCCAGAAGTTAATG	PCR em Tempo Real de <i>AAP2</i> em H99
PRCP189	TCTAACCATTCTTGGTATCG	PCR em Tempo Real de <i>AAP3</i> em H99
PRCP190	ATGTACCACCGAGATAAAAG	PCR em Tempo Real de <i>AAP3</i> em H99
PRCP191	CGAGGCAAAGAACCACG	PCR em Tempo Real de <i>AAP4</i> em H99
PRCP192	AATCAAGATGCAAGCGTTATG	PCR em Tempo Real de <i>AAP4</i> em H99
PRCP193	ACTTACTTGGACCTCTATCCTC	PCR em Tempo Real de <i>AAP5</i> em H99
PRCP194	TTTTCGGATCAGCTTGAAACC	PCR em Tempo Real de <i>AAP5</i> em H99
PRCP195	CCTTGAAAGACCGTTTCGGC	PCR em Tempo Real de <i>AAP6</i> em H99
PRCP196	TGTCACAAGTGTTGGGTCATTG	PCR em Tempo Real de <i>AAP6</i> em H99
PRCP197	TTACATCATTTCTGCTGTGTTC	PCR em Tempo Real de <i>AAP7</i> em H99
PRCP198	CATGTATGTGAAAGCGATGG	PCR em Tempo Real de <i>AAP7</i> em H99
PRCP199	TCTCTTTCTAGGGATTCTTATC	PCR em Tempo Real de <i>AAP8</i> em H99
PRCP200	CTCCGCATATGGGCGAGAAGC	PCR em Tempo Real de <i>AAP8</i> em H99
PRCP215	AGACCGAGGAGGAGGACGCTG	PCR em Tempo Real de <i>TRP2</i> em H99
PRCP216	AAGCGTCGAATCTAGATTGGTC	PCR em Tempo Real de <i>TRP2</i> em H99
PRCP217	AGGAGATCGAGGGAATGTTCCG	PCR em Tempo Real de <i>TRP3</i> em H99
PRCP218	CGTAAGCGATCTCTCCACCG	PCR em Tempo Real de <i>TRP3</i> em H99
PRCP219	GCCAGGCCGCTGCTTTTC	PCR em Tempo Real de <i>TRP4</i> em H99
PRCP220	GGACCCATGCTTGGCGACC	PCR em Tempo Real de <i>TRP4</i> em H99
PRCP221	ATGTATCCCATCCATCGCCAC	PCR em Tempo Real de <i>TRP4</i> em H99

PRCP222	CTTGTTTCATGGGCTACTACAAC	PCR em Tempo Real de <i>TRP5</i> em H99
PRCP223	ACGCCCATCTTGGAGACGAC	PCR em Tempo Real de <i>TRP5</i> em H99
PRCP224	TACTCTCCTTATCGACAACATG	PCR em Tempo Real de <i>TRP3</i> em JEC21
PRCP225	GAAAACATCCCCTCGATCTCC	PCR em Tempo Real de <i>TRP3</i> em JEC21
PRCP226	GGAGATCGAGGGGATGTTTC	PCR em Tempo Real de <i>TRP3</i> em JEC21
PRCP227	AAGCGATCTCTCCACCGAGC	PCR em Tempo Real de <i>TRP3</i> em JEC21

*As bases em letra minúscula representam sítios de restrição incorporados aos oligonucleotídeos ou bases aleatórias adicionadas a eles para garantir a maior eficiência de ação das enzimas de restrição.

APÊNDICE B - Permeases presentes em *C. neoformans var. grubii*

Código	Nome do Gene
CNAG_02539.7	<i>AAP1</i>
CNAG_07902.7	<i>AAP2</i>
CNAG_01118.7	<i>AAP3</i>
CNAG_00597.7	<i>AAP4</i>
CNAG_07367.7	<i>AAP5</i>
CNAG_07449.7	<i>AAP6</i>
CNAG_05345.7	<i>AAP7</i>
CNAG_00574.7	<i>AAP8</i>