

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA

EXPRESSÃO DA MANOPROTEÍNA MP43 DE *Cryptococcus gattii* EM
Pichia pastoris

Trabalho de Conclusão de Curso

JÚLIA CATARINA VIEIRA REUWSAAT

Porto Alegre, Julho de 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA

EXPRESSÃO DA MANOPROTEÍNA MP43 DE *Cryptococcus gattii* EM
Pichia pastoris

JÚLIA CATARINA VIEIRA REUWSAAT

Trabalho apresentado como um dos requisitos
para obtenção do Grau de Bacharel em
Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia
Molecular.

Orientadora: Lívia Kmetzsch Rosa e Silva

Co-Orientadora: Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, Julho de 2014.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à UFRGS pela oportunidade e a todos os professores pelo ensino de excelência;

Em especial, à minha orientadora professora Lívia Kmetzsch pelos ensinamentos, dedicação, apoio e amizade. À minha também orientadora professora Marilene Vainstein pela confiança e oportunidade única;

Aos professores Charley Staats e Augusto Schrank pelos ensinamentos e ajuda constante;

Aos meus pais e avós pelo amor e dedicação e ao meu irmão pelos conselhos e por ter me incentivado a estudar na UFRGS;

Aos meus amigos dos laboratórios 222, 220 e 217 do Centro de Biotecnologia pelo companheirismo e a todos os amigos de Porto Alegre e São Leopoldo pelo carinho e amizade, mesmo nós estando distantes na maioria do tempo;

Ao Júnior pelo amor e amizade;

À minha família e a todos que contribuíram de alguma maneira para a realização desse trabalho;

Às agências de fomento CAPES e CNPq.

RESUMO

Cryptococcus gattii e *Cryptococcus neoformans* são leveduras encapsuladas e os principais agentes causadores da criptococose. Essa infecção é caracterizada por atingir os pulmões e se disseminar para o sistema nervoso central, causando meningite. *C. neoformans* infecta principalmente pacientes imunocomprometidos, embora já existam relatos de infecção em pacientes saudáveis. Já *C. gattii* infecta indivíduos imunocompetentes. As manoproteínas, que correspondem a aproximadamente 1% da composição da cápsula de *Cryptococcus*, são altamente imunogênicas e induzem resposta imune mediada por células T durante a infecção em modelo murino. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho é avaliar o potencial imunoterapêutico de uma manoproteína de *C. gattii* recombinante em ensaios de infecção experimental. Análises *in silico* do genoma de *C. gattii* evidenciaram a presença de um gene codificador de uma manoproteína com massa predita de 43 kDa, anotada como proteína hipotética conservada, a qual denominamos MP43. Essas análises sugerem que MP43 possui todas as características essenciais de uma manoproteína: uma região rica nos aminoácidos serina e treonina, em que as manoses são adicionadas; um domínio C-terminal de ancoramento à GPI; e uma região na porção N-terminal onde se localiza um peptídeo sinal para secreção. Com o intuito de expressar MP43 em *Pichia pastoris* para posterior purificação e utilização em ensaios de avaliação do potencial imunoterapêutico no tratamento da criptococose, *primers* foram projetados a fim de eliminar as regiões do peptídeo sinal e da âncora de GPI, para maior eficiência durante a purificação. O fragmento correspondente à região codificadora de MP43 foi amplificado e clonado no plasmídeo pHIL-S1, amplamente utilizado em sistemas de expressão em *P. pastoris*. Esse vetor possui uma sequência que codifica um peptídeo sinal e um promotor induzido por metanol. A confirmação da construção foi realizada por clivagem com a enzima BglII e posterior sequenciamento. A transformação em *P. pastoris* foi realizada através de eletroporação de células competentes de duas linhagens diferentes da levedura: KM71, que possui o gene *AOX1* que codifica a enzima álcool oxidase deletado e GS115, que possui o gene *AOX1* intacto. Ambas as linhagens possuem o gene *HIS4* não funcional. Inicialmente foram obtidas 4 colônias recombinantes, duas da linhagem KM71 e duas da linhagem GS115. A expressão heteróloga da MP43 nessas quatro linhagens não foi bem sucedida e estamos realizando outro processo de transformação para avaliação de novos transformantes. Após a expressão e purificação da manoproteína MP43 serão realizados testes para avaliar o potencial imunoterapêutico da mesma em modelo murino de criptococose.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans and *Cryptococcus gattii* are encapsulated yeasts, the etiological agents of cryptococcosis in humans. This disease is characterized by lung infection that may spread to the brain, causing meningoencephalitis. *C. neoformans* infects preferentially patients with compromised immune system, while *C. gattii* has the ability to infect immunocompetent individuals. The mannoproteins, which correspond to approximately 1% of the composition of *Cryptococcus* capsule, are highly immunogenic and elicit immune responses mediated by T cells during the infection in a murine model. In this context, the aim of this study is to evaluate the immunotherapeutic potential of one recombinant mannoprotein of *C. gattii* in trials of experimental infection. *In silico* analysis of the *C. gattii* genome revealed the presence of one mannoprotein with a predicted molecular mass of 43 kDa, annotated as a conserved hypothetical protein, which we named MP43. This analysis suggested that MP43 has all the essential features of a mannoprotein: a serine-threonine-rich region; one C-terminal domain for GPI anchoring; and a signal peptide on the N-terminal domain for secretion. In order to express the mannoprotein MP43 in *Pichia pastoris* for subsequent purification and use in immunotherapeutic trials, primers were designed to eliminate the regions that code for the signal peptide and the GPI anchor, to increase the efficiency during the purification. The fragment was amplified and cloned into the pHIL-S1 plasmid, widely used in *P. pastoris* expression systems. This vector comprises a sequence encoding a signal peptide and a promoter induced by methanol. The confirmation of the construct was made by cleavage with BglII and subsequent sequencing. Transformation of *P. pastoris* was carried out by electroporation with competent cells of two different strains of the yeast: KM71, which has the *AOX1* gene that encodes alcohol oxidase enzyme deleted and GS115, which has the *AOX1* gene intact. Both strains have the *HIS4* gene not functional. The insertion of the vector into the yeast genome occurred via homologous recombination and the transformants were selected for histidine auxotrophy. Initially, four recombinant colonies were obtained, two of the KM71 strain and two of the GS115 strain. The heterologous expression of MP43 in these four strains was not successful and we are now performing another transformation process for the evaluation of new transformants. After the expression and purification of the recombinant MP43 of *C. gattii*, tests will be conducted to evaluate the immunotherapeutic potential in a murine model of cryptococcosis.

LISTA DE ABREVIACOES

AIDS	síndrome da imunodeficincia adquirida
BCS	cido dissulfnico batocuprona
BMG	meio glicerol tamponado
BMGY	meio glicerol complexo tamponado
BMM	meio metanol tamponado
BMMY	meio metanol complexo tamponado
BSA	albumina sérica bovina
CD4+	linfócito T helper
CD8+	linfócito T citotóxico
cDNA	DNA complementar
DEPC	pirocarbonato de dietila
DNA	cido desoxirribonucleico
DTT	ditiotreitol
EDTA	cido etilenodiaminotetracético
GalXM	galactoxilomanana
GPI	glicosilfosfatidilinositol
GXM	glucuronoxilomanana
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ	interferon gama
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-13	interleucina 13
IL-17	interleucina 17
IL-23	interleucina 23

LB	<i>Luria Broth</i>
kDa	kilo dalton
MD	meio mínimo dextrose
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
MM	meio mínimo metanol
MP43	manoproteína 43
MP98	manoproteína 98
OD	densidade óptica
ORF	fase aberta de leitura
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
pI	ponto isoelétrico
RAPD	amplificação randômica de polimorfismos
RNA	ácido ribonucleico
RNAseq	sequenciamento de RNA
RPK	<i>reads</i> por kilobase
RPKM	<i>reads</i> por kilobase por milhão
RPM	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis(2-piridil-metil)etilenodiamino
YPD	<i>yeast-extract/peptone/dextrose</i>
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Especificação de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> e seus diferentes sorotipos e genótipos.....	2
Figura 2. Ciclo infeccioso de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	3
Figura 3. Equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 durante infecção por <i>Cryptococcus</i> spp.	5
Figura 4. Caracterização de N-glicosilação e O-glicosilação em mamíferos e fungos.....	9
Figura 5. Predição do peptídeo sinal da MP43 de <i>C. gattii</i>	21
Figura 6. Análise de regiões ricas nos aminoácidos serina e treonina na proteína MP43 predita..	22
Figura 7. Níveis relativos de transcritos que codificam MP43 em condições de interação com o hospedeiro e na privação de micronutrientes.	24
Figura 8. Amplificação da região codificadora de MP43 e clonagem no plasmídeo pHIL-S1..	25
Figura 9. Confirmação da clonagem da região codificadora de MP43 no vetor de expressão pHIL-S1 por clivagem.....	26
Figura 10. Transformação do plasmídeo recombinante pHIL-S1_MP43 em <i>P. pastoris</i> linhagens KM71 e GS115..	28
Figura 11. Indução da expressão da proteína albumina na linhagem controle GS115 Alb de <i>P.pastoris</i>	289
Figura 12. Indução da expressão da manoproteína MP43 utilizando a linhagem GS115-1 de <i>P.pastoris</i>	30
Figura 13. Testes de indução da expressão da manoproteína MP43 com os transformantes KM71-1, KM71-2, GS115-1 e GS115-2 de <i>P. pastoris</i>	31
Figura 14. Análise de proteínas intracelulares das linhagens GS115-1, GS115-2 e KM71-2 de <i>P. pastoris</i> após 144 horas de indução..	32
Figura 15. PCR para amplificação da região codificadora de MP43 em quatro linhagens transformantes de <i>P. pastoris</i>	32
Figura 16. Indução da expressão de MP43 com os novos transformantes KM71-2, KM71-4, KM71-5, GS115-4 e GS115-6 de <i>P. pastoris</i>	33
Figura 17. Análise de proteínas intracelulares e associadas à parede celular nos transformantes KM71-2, KM71-4, KM71-5, GS115-4 e GS115-6 de <i>P. pastoris</i>	34
Figura 18. Análise da presença de glicoproteínas em extratos proteicos dos transformantes GS115-4 e GS115-6 de <i>P. pastoris</i>	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Modificações na sequência da região codificante da manoproteína MP43 de <i>C. gattii</i> para amplificação e clonagem em vetor de expressão.....	22
Tabela 2. Primers para a amplificação da sequência codificadora de MP43 para expressão...	23
Tabela 3. Predição de O-glicosilação pelo algoritmo GlycoEP.	23
Tabela 4. Confirmação da clonagem da região codificadora de MP43 no vetor de expressão pHIL-S1 por sequenciamento.....	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais	1
1.2. Criptococose e resposta imune	2
1.3. Fatores de virulência em <i>Cryptococcus</i> spp.	5
1.3.1. Termotolerância	6
1.3.2. Cápsula polissacarídica	6
1.3.3. Produção de melanina	6
1.3.4. Urease.....	6
1.4. Manoproteínas	7
1.5. <i>Pichia pastoris</i>	9
1.6. Tratamentos convencionais x tratamentos alternativos para a criptococose	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo geral	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1. Linhagens.....	13
3.2. Meios de cultura.....	13
3.3. Análise <i>in silico</i> do gene MP43 de <i>C. gattii</i>	13
3.4. RNAseq.....	14
3.5. Extração de RNA.....	14
3.6. Síntese de cDNA.....	15
3.7. Clonagem da região codificadora de MP43 no vetor de expressão pHIL-S1.....	15
3.8. Transformação em <i>E. coli</i> TOP10F'	16
3.9. Confirmação da construção do plasmídeo recombinante pHIL-S1_MP43	16
3.10. Transformação do vetor pHIL-S1_MP43 em <i>P. pastoris</i>	16
3.11. Expressão heteróloga de albumina em <i>P. pastoris</i>	16
3.12. Quantificação proteica	17
3.13. Espectrometria de massas	17
3.14. Expressão heteróloga de MP43 em <i>P. pastoris</i>	18
3.15. Produção de extrato proteico intracelular de <i>P. pastoris</i>	18
3.16. <i>Screening</i> dos novos transformantes de <i>P. pastoris</i>	18

3.17. SDS-PAGE	18
3.18. Análise de proteínas glicosiladas	19
4. RESULTADOS.....	20
4.1. Análise <i>in silico</i> da manoproteína MP43 de <i>C. gattii</i>	20
4.2. Características gerais	20
4.2.1. Peptídeo sinal	20
4.2.2. Âncora de GPI.....	21
4.2.3. Potenciais regiões de glicosilação: presença de regiões ricas nos aminoácidos serina e treonina	21
4.3. Construção de <i>primers</i> para amplificação parcial da região codificadora de MP43	22
4.4. Análise preditiva de O-glicosilação	23
4.5. Análise da expressão de MP43 em condições de interação com o hospedeiro	24
4.6. Construção do plasmídeo recombinante	24
4.7. Confirmação da construção do plasmídeo recombinante	25
4.8. Transformação em <i>P. pastoris</i>	28
4.9. Expressão heteróloga de albumina em <i>P. pastoris</i> para otimização das condições de cultivo e expressão.....	28
4.10. Expressão heteróloga de MP43 em <i>P. pastoris</i>	29
5. DISCUSSÃO.....	36
6. CONCLUSÕES.....	39
7. PERSPECTIVAS.....	40
8. REFERÊNCIAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais

C. neoformans e *C. gattii* são leveduras patogênicas e os principais agentes responsáveis pela infecção e desenvolvimento da criptococose em seres humanos. As duas espécies variam em sua distribuição geográfica, epidemiologia, patologia e características moleculares (Cogliati, 2013). Estima-se que *C. gattii* e *C. neoformans* divergiram de um ancestral comum há 18,5 e 37 milhões de anos, respectivamente (Lin e Heitman, 2006).

C. gattii pode ser subdividido nos sorotipos B e C, possuindo quatro tipos moleculares: VGI, VGII, VGIII e VGIV, sendo os dois primeiros associados à infecção em indivíduos saudáveis e os dois últimos à infecção em indivíduos imunocomprometidos (Byrnes *et al.*, 2011). Os tipos moleculares VGI e VGII estão associados ao sorotipo B, e VGIII e VGIV ao sorotipo C (Lin e Heitman, 2006). O genótipo VGII é dividido em três principais sub-genótipos: VGIIa, VGIIb, e VGIIc, emergentes no Noroeste do Pacífico. O sub-genótipo VGIIa possui fenótipo de hipervirulência quando comparado ao sub-genótipo VGIIb, enquanto VGIIc tem perfil de virulência similar ao do sub-genótipo VGIIa (Byrnes *et al.*, 2010). Primeiramente, acreditava-se que a ocorrência de *C. gattii* era limitada às regiões tropicais e subtropicais, como Austrália, Nova Zelândia e sudeste da Ásia (Kwon-Chung e Bennett, 1984). Porém, este panorama foi alterado após o surto de infecção por *C. gattii* sorotipo B, tipo molecular VGII, na ilha de Vancouver, Canadá, no ano de 1999, admitindo-se também a existência desta espécie em regiões temperadas (Datta *et al.*, 2009). Um trabalho recente de Hagen e colaboradores (Hagen *et al.*, 2013) indica que há maior probabilidade do genótipo VGII de *C. gattii* ter tido origem na América do Sul, mais especificamente na Amazônia e, a partir desse local, ter se disseminado para o noroeste da América do Norte, sendo responsável pelo surto em Vancouver, Canadá.

C. neoformans é um patógeno ubíquo de distribuição mundial e é caracterizado pela existência de três diferentes sorotipos: A (*C. neoformans* var. *grubii*), D (*C. neoformans* var. *neoformans*) e o híbrido AD. O sorotipo A é constituído pelos tipos moleculares VNI, VNII e VNB, o sorotipo D pelo tipo molecular VNIV, e o sorotipo híbrido AD é constituído pelo tipo molecular VNIII (Lin e Heitman, 2006) (Figura 1).

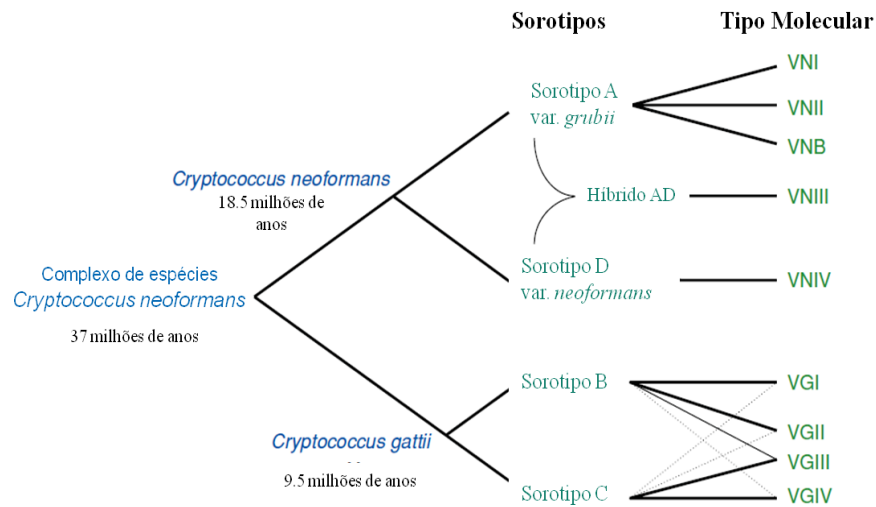


Figura 1. Especiação de *C. neoformans* e *C. gattii* e seus diferentes sorotipos e genótipos. Estima-se que *C. neoformans* e *C. gattii* tenham divergido há 37 e 18,5 milhões de anos, respectivamente. Existem três diferentes sorotipos de *C. neoformans*: A (genótipos VNI, VNII e VNB), D (genótipo VNIV) e o híbrido AD (genótipo VNIII). São conhecidos dois sorotipos de *C. gattii*: B (genótipos VGI, VGII) e C (genótipos VGIII e VGIV). Adaptado de Lin e Heitman (2006).

1.2. Criptococose e resposta imune

C. gattii e *C. neoformans* são fungos leveduriformes, encapsulados e os principais agentes causadores da criptococose. Essa infecção é caracterizada por atingir os pulmões e se disseminar para o sistema nervoso central, causando meningite. Atinge principalmente pacientes imunocomprometidos, porém há incidência marcante em pacientes imunocompetentes. Estimativas apontam um milhão de casos de infecção por *C. neoformans* no mundo, gerando 620 mil mortes anualmente (Park *et al.*, 2009). Infecções por *C. gattii* e *C. neoformans* ocorrem com maior prevalência em pacientes que possuem resposta de células T deficiente, como, por exemplo, pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS), transplantados, portadores do vírus da hepatite B ou C ou pacientes tratados com imunossupressores (Mitchell e Perfect, 1995; Husain *et al.*, 2001). Estimativas do ano de 2009 apontam que até 12% dos pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) no mundo desenvolve criptococose e, em alguns países da África, *C. neoformans* desponta como a causa mais comum de meningite (Park *et al.*, 2009). No Brasil, *C. neoformans* é o maior causador de micose sistêmica em pacientes com AIDS, causando até 51% dos óbitos nesses indivíduos (Prado *et al.*, 2009). Dados da Secretaria Estadual da Saúde

do Rio Grande do Sul (SES-CEVS-TABNET) demonstram que, de 2007 a dezembro de 2013, aproximadamente 20% dos pacientes notificados com meningite por *Cryptococcus* foram a óbito por complicações da doença (Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul, 2013).

A infecção humana por leveduras do gênero *Cryptococcus* é adquirida de fontes ambientais, sendo que *C. gattii* está predominantemente associado a árvores de eucaliptos (*Eucalyptus calmadulensis*) e madeiras em decomposição (Ma e May, 2009). Já *C. neoformans* é isolado de solo e excretas de aves, principalmente pombos (*Columba livia*), os quais são considerados a maior fonte ambiental desta levedura (Casali *et al.*, 2003; Ma e May, 2009). A infecção ocorre por inalação de esporos ou leveduras dessecadas presentes no ambiente (Lin e Heitman, 2006) (Figura 2). Em modelo murino de infecção, *C. gattii* (linhagem R265, isolada de pacientes infectados no surto de Vancouver, Canadá) fica mais restrito à infecção pulmonar, raramente se disseminando para o sistema nervoso central; já *C. neoformans*, que possui tropismo acentuado pelo tecido cerebral, pode causar uma forma mais grave da doença, caracterizada por um quadro de meningoencefalite (Perfect, 2012).

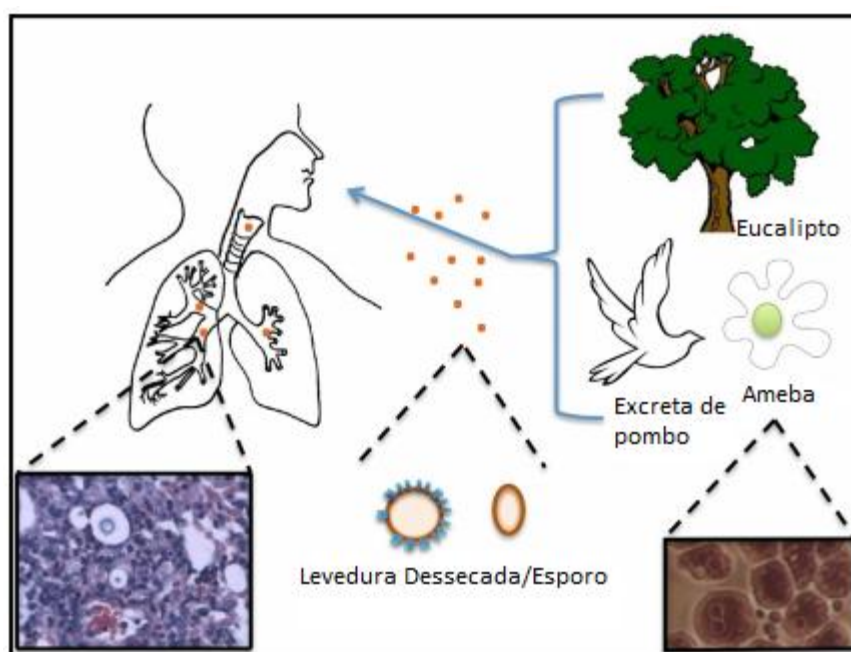


Figura 2. Ciclo infeccioso de *C. neoformans* e *C. gattii*. *Cryptococcus* pode ser isolado do ambiente, associado a árvores de eucalipto, solo, excreta de pombos e amebas. Os pombos são considerados a principal forma de dispersão do fungo. A infecção ocorre por inalação de esporos ou células dessecadas, que se depositam nos alvéolos pulmonares, causando pneumonia, e podem se disseminar para o sistema nervoso central, causando meningoencefalite. Adaptado de Coelho, Bocca e Casadevall (2014).

Após a deposição das células fúngicas no pulmão, o primeiro contato com o sistema imune é a interação com os macrófagos alveolares. Após a fagocitose de *Cryptococcus* por macrófagos, a levedura pode ser eliminada pela apresentação de antígenos às células T, pode entrar em um estado de latência ou pode sobreviver e estabelecer a infecção pulmonar (Mcquiston e Williamson, 2012). Para a disseminação ao sistema nervoso central, as leveduras do gênero *Cryptococcus* podem atravessar a barreira hematoencefálica por transporte mediado por macrófagos alveolares, mecanismo denominado como “Cavalo de Tróia” ou por transcitose direta, processo no qual as células fúngicas sofrem alterações morfológicas para interagir com as células endoteliais (Kronstad *et al.*, 2011).

A resposta mediada por células T inicia-se nos órgãos linfoides secundários, havendo o reconhecimento do complexo peptídeo-MHC exposto nas células apresentadoras de antígenos (APCs) por células T virgens, pois os linfócitos T não são capazes de reconhecer antígenos na forma nativa. Após a ativação das células T, por reconhecimento de MHC do tipo I ou II, as mesmas se proliferam através da resposta autócrina à Interleucina-2 (IL-2) e podem ativar resposta de linfócitos T helper ou citotóxico. A principal resposta imune contra leveduras do gênero *Cryptococcus* é através da ativação de linfócitos T helper (CD4+) pela apresentação de antígenos via MHC do tipo II, porém a ativação de linfócitos T citotóxicos (CD8+) não pode ser descartada (Huffnagle *et al.*, 1994).

A resposta Th1 é caracterizada pela secreção de INF- γ , TNF- α e IL-12, ativação de macrófagos e indução de linfócitos B para opsonização do patógeno. Neste caso, *Cryptococcus* é eliminado pela ativação clássica de macrófagos (Kawakami *et al.*, 1995; Hoag *et al.*, 1997; Herring *et al.*, 2002; Wormley *et al.*, 2007). Também já foi demonstrado que a secreção de IL-17 e IL-23 é capaz de induzir uma resposta chamada de Th17, ativando macrófagos e protegendo o hospedeiro (Müller *et al.*, 2007). A resposta Th2 é caracterizada pela secreção de IL-4, IL-10 e IL-13, ativação de linfócitos B para produção de anticorpos e alternativa ativação de macrófagos. Na infecção por *Cryptococcus*, há indução de células do sistema imune inato para fagocitar o patógeno, porém a levedura consegue se proliferar (Hoag *et al.*, 1997; Koguchi e Kawakami, 2002; Wozniak *et al.*, 2012). Geralmente o equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 está relacionado a surtos da infecção de, preferencialmente, patógenos intracelulares (Koguchi e Kawakami, 2002). Já foi mostrado que a troca de resposta Th1 para Th2 induz a expressão de fatores de virulência em *C. neoformans* (Osterholzer *et al.*, 2009) (Figura 3). Porém, apenas uma resposta Th1 e Th17 forte não foi capaz de proteger camundongos contra a infecção e disseminação de *C. neoformans* (linhagem H99) para o

Sistema Nervoso Central (Zhang *et al.*, 2009). Uma possível explicação para a efetividade de *C. gattii* em infectar pacientes imunocompetentes pode estar associada à modulação da maturação de células dendríticas. Essas células, como apresentadoras de antígenos, são eficazes em internalizar e eliminar células fúngicas de *C. gattii*, porém as células dendríticas imaturas falham ao entrar no processo de maturação, não havendo aumento de expressão de MHC do tipo II, o que leva a uma resposta de células T diminuída (Huston *et al.*, 2013).

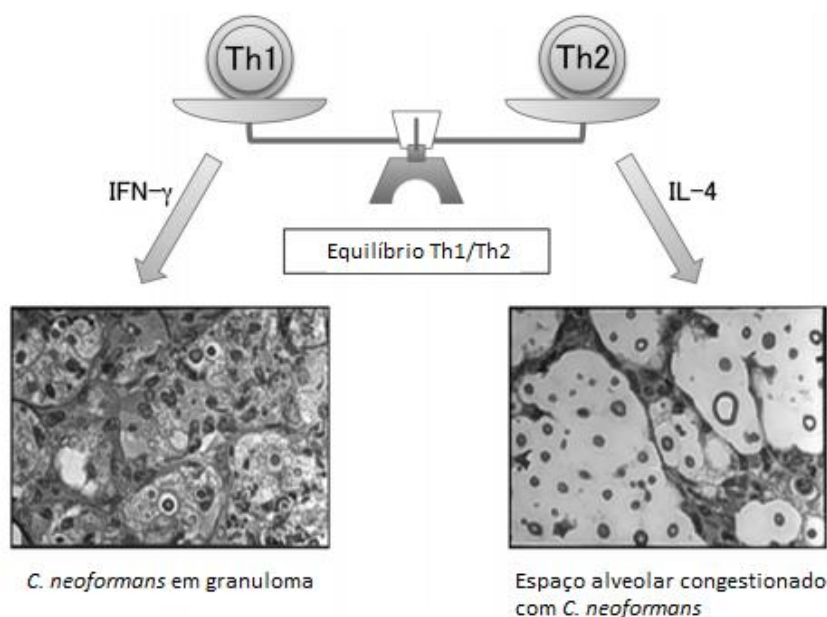


Figura 3. Equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 durante infecção por *Cryptococcus* spp. Células do sistema imune inato controlam a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ através da produção de citocinas. Quando há produção de IL-2 pelas células apresentadoras de antígenos após a fagocitose de *Cryptococcus* spp., linfócitos T CD4⁺ virgens se diferenciam em linfócitos Th1. Essas células produzem IFN- γ , há ativação de macrófagos e é possível visualizar células de *C. neoformans* em granulomas no interior dos macrófagos. Quando há produção de IL-4 pelas células apresentadoras de antígenos após a fagocitose de *Cryptococcus* spp., células T CD4⁺ virgens se diferenciam em linfócitos Th2. Essas células produzem IL-4 e é possível visualizar a proliferação de *C. neoformans* no espaço alveolar. Adaptado de Ishii e Kawakami (2012).

1.3. Fatores de virulência em *Cryptococcus* spp.

A sobrevivência de *Cryptococcus* sp. no hospedeiro é possível pela expressão e combinação de distintos fatores de virulência e, também, pela suscetibilidade do hospedeiro. Tanto *C. neoformans* quanto *C. gattii* possuem fatores de virulência bem estabelecidos e, alguns deles, serão elucidados abaixo:

1.3.1. Termotolerância

As espécies de *Cryptococcus* patogênicas de mamíferos possuem a capacidade de se desenvolver a 37°C. Essa habilidade pode explicar a distribuição mundial de *C. neoformans* e *C. gattii* e é uma característica que diferencia outras espécies de *Cryptococcus* que não conseguem estabelecer a infecção, mas possuem outros fatores de virulência, como a cápsula polissacarídica e produção de melanina (Coelho *et al.*, 2014).

1.3.2. Cápsula polissacarídica

Além da parede celular de *Cryptococcus*, composta por oligômeros de quitina e quitosana, a levedura também é envolvida por uma cápsula polissacarídica. Essa cápsula é composta pelos polissacarídeos glucuronoxilomanana (GXM), galactoxilomana (GalXM) e por manoproteínas. Essa estrutura pode atingir um tamanho muitas vezes maior do que o diâmetro do corpo celular da levedura no momento da infecção, e confere vantagem ao fungo no processo de interação patógeno-hospedeiro (Coelho *et al.*, 2014). A cápsula de *C. neoformans* e *C. gattii* é imunomodulatória e pode afetar a migração de células do sistema imune (Ellerbroek *et al.*, 2004; Ellerbroek *et al.*, 2004), inibir a secreção de citocinas (Siegemund e Alber, 2008), interferir na apresentação de antígenos via MHC (Villena *et al.*, 2008) e impedir a proliferação de células do sistema imune inato (Lupo *et al.*, 2008). Provavelmente, a mais importante função da cápsula seja a interferência na fagocitose, pois há ausência da mesma quando as células fúngicas não são opsonizadas (Shoham e Levitz, 2005; Coelho *et al.*, 2014).

1.3.3. Produção de melanina

A produção de melanina é importante para a virulência de leveduras do gênero *Cryptococcus*, sendo este pigmento sintetizado pela enzima lacase. Mutantes de *C. neoformans* para essa enzima têm sua virulência atenuada em modelo murino de infecção (Kwon-Chung *et al.*, 1982). Além de a melanina ser uma molécula antioxidante, ela também é um importante componente da estrutura da parede celular de *Cryptococcus* e é reconhecida por anticorpos durante modelo de infecção murino experimental (Rosas *et al.*, 2001).

1.3.4. Urease

A enzima urease é responsável pela hidrólise da ureia, gerando amônia e CO₂, o que facilita a captação de nitrogênio pela levedura. Esta enzima pode estar relacionada com

a disseminação de *Cryptococcus* para o cérebro, pois mutantes nulos para o gene codificador de urease foram capazes de causar meningoencefalite em modelo murino de infecção, mas não pneumonia (Cox *et al.*, 2000).

1.4. Manoproteínas

Manoproteínas correspondem a aproximadamente 1% da composição da cápsula de *Cryptococcus* (Levitz *et al.*, 2001) e têm a capacidade de ativar resposta imune no hospedeiro (Huang *et al.*, 2002). A resposta imune mediada por células T é essencial para defesa do hospedeiro durante o desenvolvimento da criptococose (Voelz e May, 2010), e manoproteínas são capazes de induzir este tipo de resposta (Levitz e Specht, 2006). Manoproteínas possuem algumas características essenciais, como a presença de uma região rica nos aminoácidos serina e treonina, local no qual ocorre a O-glicosilação, uma âncora de GPI e um peptídeo sinal para secreção (Levitz e Specht, 2006). A âncora de GPI serve para se ligar à membrana plasmática ou à β -1,6-glicanos da parede celular e a clivagem da âncora pode levar à exportação da proteína (Djordjevic *et al.*, 2005). No genoma de *C. neoformans*, foram encontrados 40 genes putativos codificadores de manoproteínas (Levitz e Specht, 2006).

Mais da metade das proteínas encontradas no sobrenadante de *C. neoformans* são manoproteínas (Mansour, Schlesinger e Levitz, 2002) e, as que não são secretadas, estão associadas ao lado interno da parede celular (Vartivarian *et al.*, 1989). Esta característica difere de *Candida albicans*, por exemplo, pois todas as suas manoproteínas estão expostas para o meio extracelular (Bates *et al.*, 2005). A manoproteína Cig1 de *C. neoformans* é secretada para o meio extracelular e tem sua expressão aumentada em condições de privação de ferro. É atribuída como sua função a absorção de componentes hemes para o interior da célula. A deleção do gene *CIG1*, juntamente com o gene codificador da ferroxidase *CFO1*, atenuam a virulência de *C. neoformans* em modelo de infecção murino (Cadieux *et al.*, 2013). Já a manoproteína MP98 de *C. neoformans*, foi encontrada mais próxima à parede celular do fungo, ou seja, está interagindo com a região interna da cápsula polissacarídica e a região externa da parede celular, não estando exposta ao meio (Jesus *et al.*, 2010).

Inúmeros fungos expressam manoproteínas capazes de elicitar resposta imune no hospedeiro, como, por exemplo, *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium marneffeii*. A capacidade das manoproteínas de interagirem com a parede celular

dos fungos pode contribuir com a patogenicidade dos mesmos, como visto para a manoproteína Epa1 de *Candida glabrata*, capaz de mediar a adesão a células epiteliais (Frieman *et al.*, 2002). A deficiência de manosição em mutantes de *C. albicans* atenua sua virulência em modelo de infecção murino (Bates *et al.*, 2005).

O processo de glicosilação em mamíferos e fungos é bastante conservado no aspecto geral, sendo as proteínas primeiramente encaminhadas ao retículo endoplasmático onde ocorre a glicosilação, posteriormente são direcionadas ao Golgi para o processamento, por fim, às organelas ou compartimentos específicos. Há uma diferença na N-glicosilação do aminoácido asparagina em relação aos tipos de monossacarídeos adicionados e na quantidade de genes codificadores de enzimas glicosiltransferases. Enquanto os mamíferos possuem uma gama maior tanto de enzimas quanto de monossacarídeos, os fungos utilizam principalmente resíduos de manose para formação de N-glicanas. Em mamíferos, os resíduos de manose são encontrados no início de N-glicanas (Levitz e Specht, 2006). As N-glicanas de proteínas fúngicas podem chegar até 200 resíduos de manoses, enquanto O-glicanas são muito menores, possuindo de dois a três resíduos de manoses. Porém, para *C. neoformans* não há predição de cadeias de manoses tão longas. A O-glicosilação dos aminoácidos serina e treonina também difere entre os mamíferos e fungos, sendo que nos fungos há apenas adição de resíduos de manoses, enquanto nos mamíferos há adição de outros vários resíduos, como, por exemplo, N-acetilglicosamina, glicose e galactose (Levitz e Specht, 2006) (Figura 4).

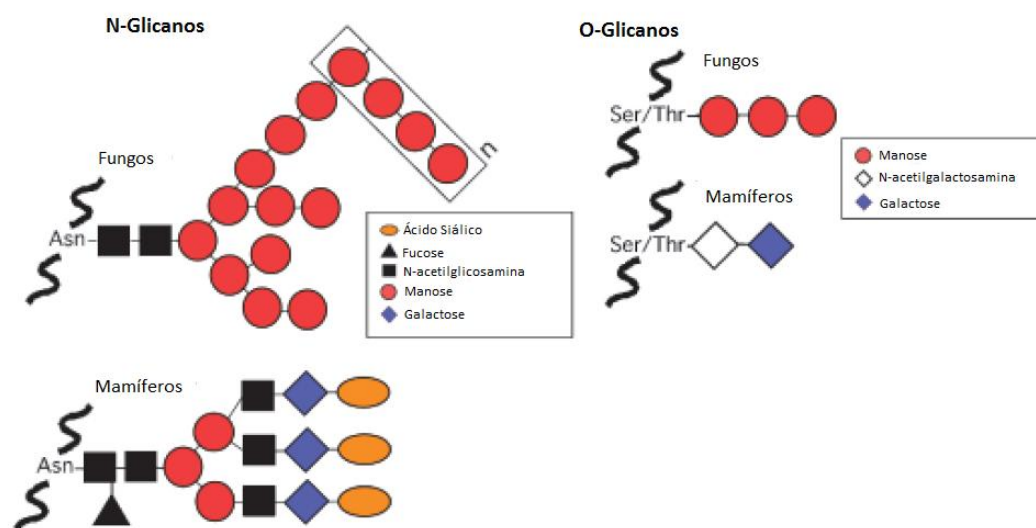


Figura 4. Caracterização de N-glicosilação e O-glicosilação em mamíferos e fungos. N-glicanas fúngicas encontradas nas proteínas da parede celular podem conter até 200 resíduos de manose (esfera rosa). Porém, tal predição não foi realizada especificamente para *C. neoformans*. N-glicanas de proteínas de mamíferos representam um exemplo de inúmeras adições ao núcleo $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. O-glicanas de fungos apresentam tipicamente de dois a três resíduos de manose, enquanto O-glicanas de mamíferos podem ter outros monossacarídeos adicionados aos aminoácidos serina e treonina. Adaptado de Levitz e Specht (2006).

A glicosilação de proteínas com resíduos de manose é essencial para a indução da resposta imune via células T no hospedeiro, através do reconhecimento de antígenos pelas células dendríticas pelos receptores de manose e apresentação dos mesmos às células T (Mansour *et al.*, 2002; Lam *et al.*, 2005). A MP98 recombinante de *C. neoformans* glicosilada foi capaz de induzir resposta de células T CD4^+ mais eficientemente, medida através da secreção de IL-2, em relação a MP98 recombinante não glicosilada, mostrando a importância da glicosilação como fator imunogênico nas manoproteínas. Apenas proteínas O-glicosiladas com resíduos de manose também foram capazes de induzir resposta imune mediada por células T. A resposta de células T foi diminuída quando células dendríticas foram pré-incubadas por inibidores dos receptores de manose, mostrando o papel das mesmas como apresentadoras de antígenos (Specht *et al.*, 2007).

1.5. *Pichia pastoris*

P. pastoris é um modelo eucariótico de expressão de proteínas heterólogas, sendo uma alternativa a utilização de modelos procarióticos de expressão, como *Escherichia coli*. A

vantagem em utilizar esse modelo eucariótico para expressão de proteínas recombinantes está na presença de processamento de proteínas e modificações pós-traducionais, como a glicosilação, modificações não encontradas em modelos procarióticos de expressão. *P. pastoris* é uma levedura capaz de metabolizar metanol, devido à presença de genes codificadores das enzimas álcool oxidase e formaldeído desidrogenase em seu genoma, e os promotores dos respectivos genes são utilizados para controle da expressão de proteínas recombinantes (De Schutter *et al.*, 2009).

P. pastoris é tão facilmente manipulada geneticamente quanto *Saccharomyces cerevisiae* e de fácil cultivo, possuindo alta taxa de crescimento. O seu genoma é constituído de quatro cromossomos e a inserção de DNA linear no genoma de *P. pastoris* acontece com alta taxa de recombinação homóloga. Essa levedura é capaz de produzir altos níveis de proteínas extracelulares e intracelulares e não é um modelo apenas para produção de proteínas recombinantes glicosiladas, pois a expressão da proteína albumina para fins terapêuticos é realizada em *P. pastoris* (Daly e Hearn, 2005).

Sistemas de glicosilação em *P. pastoris* são caracterizados por gerar modificações em proteínas específicas tanto por N-glicosilação quanto por O-glicosilação. N-glicanas são constituídas de 8 a 14 manoses, enquanto O-glicanas são menores (Bretthauer e Castellino, 1999). As N-glicanas são moléculas ramificadas, sendo os resíduos geralmente adicionados um de cada vez, enquanto O-glicanas são sintetizadas como uma cadeia única. Em diferentes linhagens de *P. pastoris*, geralmente é um resíduo de manose o último a ser adicionado na cadeia glicídica tanto de O-glicanas quanto de N-glicanas, e essa variabilidade nas cadeias glicídicas pode alterar a especificidade de ligação de antígenos nos receptores de manose (Lam *et al.*, 2005). Conforme as informações mostradas, é provável que a glicosilação entre as espécies do gênero *Cryptococcus* e *Pichia pastoris* sejam similares, pois em ambas não há predição de N-glicanas longas e as O-glicanas são formadas por cadeias curtas compostas apenas de resíduos de manose.

1.6. Tratamentos convencionais x tratamentos alternativos para a criptococose

Os principais antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose são fluconazol, flucitosina e anfotericina B. Fluconazol e anfotericina B são compostos que alteram a composição da membrana plasmática, pois interferem na síntese do principal esterol da

membrana fúngica, denominado ergosterol. A flucitosina gera deficiência no processo de transcrição, sendo ribonucleotídeos incorporados erroneamente e também interfere na replicação do DNA (Loyse *et al.*, 2013). Além do uso contínuo desses antifúngicos ser tóxico para os pacientes, o número de isolados de leveduras do gênero *Cryptococcus* resistentes está aumentando, devido à alteração na importação da droga, alterações nas enzimas alvo tanto pelo aumento no conteúdo celular quanto por alterações estruturais ou pelo aumento da expressão de proteínas transportadoras (White *et al.*, 1998; Espinel-Ingroff, 2008).

Além da busca por moléculas naturais com capacidade antifúngica (flavonoides, por exemplo), há um grande interesse na área da imunoterapia, através da utilização de anticorpos monoclonais e citocinas no tratamento da criptococose. O uso de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, melhora a resposta do sistema imune contra a infecção e o uso de INF- γ é importante para o controle do desenvolvimento da criptococose em pacientes HIV positivos (Gullo *et al.*, 2013). Tentativas de tratamento utilizando imunização com anticorpos monoclonais contra o principal polissacarídeo da cápsula de *Cryptococcus*, glicosilceramidas, melanina e β -glicanas apresentaram excelentes resultados em modelos de infecção experimental (Antachopoulos e Walsh, 2012).

Devido à toxicidade dos atuais antifúngicos no tratamento da infecção causada por *C. gattii* e *C. neoformans*, estudos que visem contribuir para inovações na área de estratégias imunoterapêuticas para a criptococose são de grande relevância. A resposta imune mediada por células T é essencial para defesa do hospedeiro durante o desenvolvimento da criptococose e as manoproteínas são altamente imunogênicas e induzem este tipo de resposta imune durante a infecção. Nesse contexto, o desenvolvimento do presente projeto visou a produção da manoproteína recombinante MP43 de *C. gattii*, com o intuito de avaliar o potencial imunoterapêutico desta manoproteína em modelo murino de infecção experimental.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial imunoterapêutico de uma manoproteína recombinante de *Cryptococcus gattii* em modelo murino de criptococose.

2.2. Objetivos específicos

- Análise *in silico* da manoproteína MP43 de *C. gattii*;
- Expressão heteróloga da manoproteína MP43 em *P. pastoris*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens

A linhagem de *C. gattii* utilizada no trabalho é proveniente do surto de criptococose ocorrido em Vancouver, Canadá, denominada R265 e foi doada gentilmente pelo Dr. Wieland Meyer. Para propagação do vetor de expressão foi utilizada a linhagem de *E. coli* TOP 10F'. Para expressão da proteína recombinante MP43 em *P. pastoris* foram utilizadas as linhagens GS115 e KM71 e, como controle, a linhagem GS115-Albumina, a qual secreta a proteína recombinante albumina (*Pichia Expression Kit*, Invitrogen). As linhagens KM71 e GS115-Albumina possuem o gene *AOX1*, codificador da enzima álcool oxidase, interrompido, sendo elas consideradas Mut^S. Em leveduras da linhagem GS115, o gene *AOX1* está íntegro, sendo ela considerada Mut⁺. Todas as linhagens de *P. pastoris* utilizadas são auxotróficas para a produção de histidina.

3.2. Meios de cultura

Para o crescimento de *E. coli* TOP10F' foi utilizado o meio de cultura *Luria Broth* (LB) e, quando necessário, foi adicionado 1,5% (v/v) de ágar. Para o crescimento das linhagens de *P. pastoris* foram utilizados os seguintes meios: YPD (2% glicose, 2% peptona e 1% extrato de levedura), MD (1,34% YNB, 4x10⁻⁵% biotina, 2% glicose), MM (1,34% YNB, 4x10⁻⁵% biotina, 0,5% metanol), BMG (100 mM fosfato de potássio monobásico pH 6, 1,34% YNB, 4x10⁻⁵% biotina, 1% glicerol), BMM (100 mM fosfato de potássio monobásico pH 6, 1,34% YNB, 4x10⁻⁵% biotina, 0,5% metanol), BMGY (1% extrato de levedura, 2% peptona, 100 mM fosfato de potássio monobásico pH 6, 1,34% YNB, 4x10⁻⁵% biotina, 1% glicerol), BMMY (1% extrato de levedura, 2% peptona, 100 mM fosfato de potássio monobásico pH 6, 1,34% YNB, 4x10⁻⁵% biotina, 0,5% metanol). Para a lise celular de *P. pastoris* foi utilizado um tampão de lise (0,05 M fosfato de sódio monobásico pH 7,4, 0,001 M EDTA e 5% glicerol), conforme instruções do fabricante.

3.3. Análise *in silico* do gene MP43 de *C. gattii*

O número de acesso da sequência gênica codificante de MP43 no Broad Institute (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans_b/MultiHome.html) é CNBG_4278. A presença do peptídeo sinal na potencial manoproteína MP43 foi avaliada pelo algoritmo Signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e as regiões ricas

em serina/treonina foram identificadas pela análise no software Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). A predição de um sítio para ligação de uma âncora de GPI foi realizada pelo algoritmo GPI-SOM (<http://gpi.unibe.ch/>). A predição da massa molecular e do ponto isoelétrico (pI) da manoproteína MP43 foi realizada no algoritmo Compute pI/Mw no portal de recursos de bioinformática ExpASy (http://web.expasy.org/compute_pi/). A análise de domínios conservados foi realizada no algoritmo PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>). A análise de O-glicosilação foi realizada no algoritmo GlycoEP (<http://www.imtech.res.in/raghava/glycoep/submit.html>).

3.4. RNAseq

Previamente, foi realizado por nosso grupo de pesquisa (Schneider *et al.*, 2012) uma análise quantitativa da expressão gênica de *C. gattii* linhagem R265 durante o processo de interação com o hospedeiro por RNAseq. Camundongos BALB/c foram infectados com 10^6 células de *C. gattii* e após 24 h foi coletado lavado brônquio-alveolar para posterior extração de RNA. Paralelamente, foram realizados cultivos de *C. gattii* em privação de micronutrientes, pela ação de quelantes de zinco (TPEN) e cobre (BCS). Para análise dos resultados e determinação da expressão diferencial de MP43 nestas condições, a qual não havia sido analisada pelo grupo de pesquisa, foi quantificado o número de *reads* referentes a transcritos do gene CNBG_4278 e este valor foi dividido pelo tamanho do transcrito em kilobases (RPK). Por fim, o valor de RPK foi dividido pelo número total de *reads* obtidos pelo sequenciamento (RPKM).

3.5. Extração de RNA

Foi extraído RNA de células de *C. gattii* cultivadas por 18 h a 30°C em 20 ml de YPD líquido. O cultivo foi centrifugado a 7.000 x g por 10 min e as células foram congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas e maceradas. Uma alíquota do macerado foi transferida para um tubo contendo 1 ml do reagente TRIzol (*Life Technologies*). Após a homogeneização manual, o extrato foi centrifugado a 12.000 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante da centrifugação foi retirado e incubado a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio ao sobrenadante e os tubos foram agitados manualmente por 15 min e incubados a temperatura ambiente por 3 min. A amostra foi submetida à centrifugação a 12.000 x g por 15 min, a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o RNA foi precipitado com 0,5 ml de isopropanol a temperatura ambiente por 10 min. Após este período, a amostra foi centrifugada a 12.000 x g por 10 min a 4°C e o

precipitado foi lavado com etanol 70%. A amostra foi ressuspensa em água previamente tratada com DEPC. Aproximadamente 1 µg de RNA foi tratado com DNase (*Thermo Scientific*) por 30 min a 37°C e inativada conforme instruções do fabricante.

3.6. Síntese de cDNA

Para síntese de cDNA foi utilizada a enzima transcriptase reversa (RT) *Inprom II* (Promega) e 0,2 µg de RNA previamente tratado com DNase, conforme instruções do fabricante. A reação foi incubada a 42°C por 1 h.

3.7. Clonagem da região codificadora de MP43 no vetor de expressão pHIL-S1

O vetor pHIL-S1 foi selecionado para a realização da expressão heteróloga em *P. pastoris* (*Pichia Expression Kit, Invitrogen*). Esse vetor possui 8.260 pb e apresenta a sequência codificadora do peptídeo sinal *PHO1*, o qual transloca a proteína recombinante para o sobrenadante de cultivo, o gene *HIS4* para seleção auxotrófica em *P. pastoris*, o promotor *AOX1* induzível à metanol, o terminador *AOX1* e marca de resistência à ampicilina para seleção em bactérias. Para a amplificação da região codificadora do gene MP43 de *C. gattii* foram projetados *primers* que excluíssem as regiões codificantes do peptídeo sinal e do sítio ômega de ancoramento à GPI. No *primer direto* foi adicionado um sítio de clivagem reconhecido pela enzima EcoRI (MP34F 5'-AAAAAAGAATTCTGCGTCCAGTTTGGACTCG-3'). No *primer reverso* foram adicionados um sítio de clivagem reconhecido pela enzima BamHI e um tag de histidinas (MP43R 5'-AAAAAAGGATCCTTAATGGTGATGGTGATGGTGAGAATTGGTACTAGCAGA-3'). A amplificação da região codificadora de MP43 foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR). A temperatura de anelamento dos *primers* foi de 55°C e o restante das condições foram seguidas conforme descrito pelo fabricante da Taq DNA polimerase *High Fidelity* (Invitrogen). Como molde para amplificação por PCR foi utilizado cDNA de *C. gattii* R265. Após a amplificação, as extremidades do *amplicon* foram clivadas com as enzimas EcoRI e BamHI simultaneamente por 2 h a 37°C. O vetor pHIL-S1 também foi clivado com as enzimas EcoRI e BamHI por 3 h a 37°C, porém a digestão ocorreu sequencialmente. Para a realização da ligação, foram utilizados 100 ng do vetor linearizado e 50 ng do inserto. A ligação foi realizada com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante.

3.8. Transformação em *E. coli* TOP10F'

A transformação do plasmídeo recombinante de pHIL-S1_MP43 em *E. coli* TOP10F' foi realizada por choque térmico, conforme Sambrook & Russell, 2001. As colônias transformantes foram selecionadas em meio LB acrescido do antibiótico ampicilina (100 µg/ml).

3.9. Confirmação da construção do plasmídeo recombinante pHIL-S1_MP43

Para a confirmação da construção do plasmídeo recombinante pHIL-S1_MP43, foi extraído DNA plasmidial de 6 colônias e realizado PCR com os *primers* MP43F e MP43R. Posteriormente, o plasmídeo foi clivado com a enzima BglIII por 3 h a 37°C, com previsão de liberação de fragmentos de 5183 pb, 2868 pb e 1291 pb. O sequenciamento do vetor foi realizado por prestação de serviços na ACTGene com os *primers* MP43F e MP43R. Para avaliação do sequenciamento, foram realizadas análises de comparação de sequências pelo algoritmo BLAST com a sequência CNBG_4278 como *query* e o resultado do sequenciamento como *subject*.

3.10. Transformação do vetor pHIL-S1_MP43 em *P. pastoris*

Após a confirmação da construção do plasmídeo recombinante, foram preparadas células eletrocompetentes de *P. pastoris* das linhagens KM71 e GS115, conforme protocolo do kit *Pichia expression kit* (Invitrogen). Foram clivados 10 µg do plasmídeo pHIL-S1_MP43 com a enzima SalI por 3 h a 37°C (sítio de clivagem localizado no gene *HIS4*) para linearização. A linearização neste sítio favorece o evento de recombinação homóloga no *locus his4* do genoma das linhagens de *P. pastoris*. A eletroporação foi realizada conforme protocolo do manual do eletroporador *Gene Pulser X-cell* (Bio-Rad). As colônias transformantes foram selecionadas em meio MD, na ausência de histidina. DNA genômico foi extraído de quatro colônias transformantes, GS115-1, GS115-2, KM71-1 e KM71-2. Para confirmação da inserção do vetor de expressão no genoma dessas linhagens, foi realizado um PCR com os *primers* MP43F e MP43R.

3.11. Expressão heteróloga de albumina em *P. pastoris*

Primeiramente foi realizada uma padronização da expressão de proteínas recombinantes em *P. pastoris* com a linhagem controle GS115-Alb, a qual secreta albumina para o meio de cultivo. Para isso, foram testados os diferentes meios de indução: MD, BMG,

BMGY, MM, BMM e BMMY (*Pichia Expression Kit*, Invitrogen). A indução da expressão de albumina recombinante foi padronizada como segue: primeiramente foi realizado um inóculo da linhagem em 20 ml de YPD a 30°C e 200 rpm durante 16-18 h. Posteriormente, um alíquota de 500 µL foi submetida a centrifugação a 15.700 x g por 2 min, e o precipitado de células foi ressuscitado em 500 µL de YNB 1X. Esta suspensão de células foi inoculada em 100 ml de BMGY a 30°C e 200 rpm até atingir $OD_{600} = 2 - 6$. Posteriormente, o cultivo em BMGY foi centrifugado a 3.000 x g por 5 min e as células foram ressuscitadas em 20 ml de BMMY. Para a indução da expressão, metanol foi adicionado na concentração final de 0,5% v/v a cada 24 h, por um total de 144 h.

3.12. Quantificação proteica

A quantificação de proteínas presentes no sobrenadante do cultivo de cada ensaio de indução foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Para isto, 1 ml do reagente de Bradford (Bio-Rad) foi incubado com 20 µL do sobrenadante de cada cultivo e a absorbância da amostra foi determinada em espectrofotômetro a 595 nm. A curva padrão utilizada para conversão da absorbância em concentração proteica foi realizada com concentrações distintas de BSA.

3.13. Espectrometria de massas

Para confirmação da expressão da albumina, amostras de sobrenadantes dos cultivos obtidos conforme descrito acima foram analisados em gel de poliacrilamida 12%, conforme protocolo descrito (Sambrook & Russel, 2001). Para visualização das proteínas após eletroforese, o gel foi submergido em solução de Coomassie G (50% metanol, 10% ácido acético, 0,05% Coomassie Brilliant Blue R-250). A banda teoricamente correspondente à albumina foi excisada e incubada em solução Destain (50% metanol e 5% ácido acético) para descoloração por 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, o gel foi desidratado com acetonitrila (100%) e reduzido com DTT (10 mM). Após a redução, o gel foi alquilado com iodoacetamida e lavado com bicarbonato de amônio 100 mM e desidratado novamente. Foi realizada a tripsinização da amostra e posteriormente a extração dos peptídeos com solução de bicarbonato de amônio 100 mM. A espectrometria de massas foi realizada no Uniprote-MS do Centro de Biotecnologia.

3.14. Expressão heteróloga de MP43 em *P. pastoris*

As condições para expressão da proteína recombinante MP43 com os transformantes KM71-1 e KM71-2 foram as mesmas utilizadas para a albumina, pois ambas apresentam fenótipo Mut^s. A expressão da MP43 utilizando os transformantes GS115-1 e GS115-2 ocorreu nas mesmas condições, com exceção da concentração de células utilizadas no inóculo para indução ($OD_{600} = 1$ em volume final de 100 ml). Para indução da expressão da proteína recombinante, foi adicionado metanol na concentração final de 0,5% v/v a cada 24 h, por 144 h. Para as linhagens KM71-2, GS115-1 e GS115-2 também foi testada a concentração final de 0,8% v/v de metanol.

3.15. Produção de extrato proteico intracelular de *P. pastoris*

Para obtenção de um extrato proteico intracelular, a lise das células de *P. pastoris* (transformantes KM71-1, KM71-2, GS115-1 e GS115-2) foi realizada a partir da adição de 100 μ L do tampão de lise e um volume equivalente de pérolas de vidro (0.2 mm) ao precipitado celular, obtido pela centrifugação de 1 ml de cultivo. Cada amostra foi submetida a 8 ciclos de agitação em vórtex por 30 s e posterior incubação em gelo por 30 s. Finalmente, as amostras foram submetidas a centrifugação a 15.700 x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi retirado e armazenado em um novo tubo.

3.16. *Screening* dos novos transformantes de *P. pastoris*

Foi realizado um teste de indução da expressão em menor escala utilizando 13 novos transformantes de *P. pastoris* dos 124 obtidos em uma segunda etapa de transformação. De acordo com instruções recomendadas pelo fabricante, este teste foi realizado em tubos plásticos de 50 ml. Os transformantes obtidos após transformação das duas linhagens, GS115 e KM71, foram inoculados em 5 ml de BMGY a 30°C e 200 rpm até atingir $OD_{600} = 2 - 6$. Posteriormente, o cultivo foi submetido à centrifugação (3,000 x g por 5 min), e o inóculo para indução foi realizado em meio BMMY, em um volume final de 10 ml ($OD_{600} = 1$) para transformantes da linhagem GS115. Para a linhagem KM71, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em 4 ml de BMMY. O metanol foi adicionado na concentração final de 0,5% v/v a cada 24 h, por 144 h.

3.17. SDS-PAGE

Para a realização da eletroforese em gel SDS-PAGE, 1 ml de cada cultivo da indução

foi retirado a cada 24 h e submetido à centrifugação para separação do precipitado de células e sobrenadante de cultivo. As proteínas do sobrenadante foram precipitadas com Ácido tricloroacético (TCA) na concentração final de 10% v/v. Foram utilizados os géis comerciais *Mini-PROTEAN TGXPrecast Gels*(Bio-Rad), com gradiente de concentração de poliacrilamida variando de 4% a 20%. A eletroforese foi realizada em uma cuba vertical a 100 V. Foi utilizado o marcador de massa molecular *ColorBurst* (Sigma-Aldrich), cujas massas moleculares variam de 8 kDa a 220 kDa.

3.18. Análise de proteínas glicosiladas

Foi realizada uma análise por eletroforese em gel SDS-PAGE e o gel foi corado com soluções do kit *Glycoprotein Detection Kit*(Sigma-Aldrich), conforme instruções do fabricante.

4. RESULTADOS

4.1. Análise *in silico* da manoproteína MP43 de *C. gattii*

Manoproteínas possuem algumas características essenciais, como a presença de uma região rica nos aminoácidos serina e treonina, local no qual ocorre a O-glicosilação, uma âncora de GPI e um peptídeo sinal para secreção (Levitz e Specht, 2006). A manoproteína MP43 de *C. gattii* foi selecionada como alvo para expressão heteróloga em *P. pastoris*. Esta escolha foi baseada em dados prévios de análise de expressão gênica global, os quais evidenciaram que o ortólogo de MP43 em *C. neoformans* foi diferencialmente expresso em condições de privação de micronutrientes. No genoma de *C. gattii* disponível na plataforma do *Broad Institute*, MP43 foi anotada como uma proteína hipotética conservada. Após a predição *in silico* de sua massa molecular, a denominamos MP43 (ManoProteína de 43 KDa), seguindo a denominação já utilizada para outras manoproteínas de *C. neoformans*. Entretanto, para esta predição foi utilizada apenas a sequência de aminoácidos correspondente a região codificadora, sem considerar as possíveis modificações pós-traducionais relacionadas à glicosilação que devem estar presentes na proteína madura. A seguir, serão apresentados os resultados relacionados às análises *in silico* para caracterização de MP43 em *C. gattii*.

4.2. Características gerais

O gene codificador da manoproteína MP43 possui 1.427 nucleotídeos e a proteína correspondente é composta por 412 aminoácidos. Sua massa predita é 43 kDa e seu pI predito é 4.31. Foram realizadas buscas em bancos de dados de domínios conservados do NCBI utilizando a sequência predita de aminoácidos de MP43, entretanto não foi encontrado nenhum domínio conservado.

4.2.1. Peptídeo sinal

A presença de peptídeo sinal na manoproteína MP43 foi avaliada através da utilização do algoritmo SignalP, o qual indicou a presença do mesmo e o possível sítio de clivagem para sinalpeptidase entre os aminoácidos 18 e 19 da proteína (Figura 5).

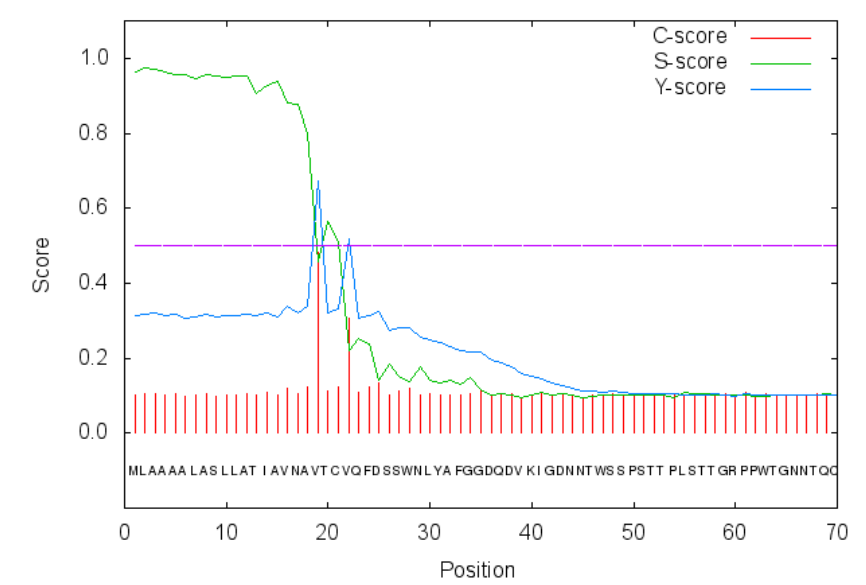


Figura 5. Predição do peptídeo sinal da MP43 de *C. gattii*. Predição da presença do peptídeo sinal e do sítio de clivagem entre o 18º e 19º aminoácido da proteína. *Score-C*, probabilidade da ocorrência da clivagem pela enzima sinal peptidase. *Score-S* e *Score-Y*, hidrofobicidade, o peptídeo sinal deve estar ancorado em uma membrana. A predição foi realizada pelo algoritmo SignalP.

4.2.2. Âncora de GPI

A presença de uma âncora de GPI foi analisada pelo algoritmo GPI-SOM e o mesmo apontou um possível sítio ômega no aminoácido 383 da manoproteína MP43.

4.2.3. Potenciais regiões de glicosilação: presença de regiões ricas nos aminoácidos serina e treonina

As regiões ricas nos aminoácidos serina e treonina foram avaliadas pelo programa BioEdit. Para melhor visualização dos resultados, foi gerado um gráfico com as porcentagens de serina e treonina a cada 20 aminoácidos da sequência completa (Figura 6). É possível identificar uma predominância destes aminoácidos a partir do 321º aminoácido da sequência peptídica, indicando a possível região de O-glicosilação.

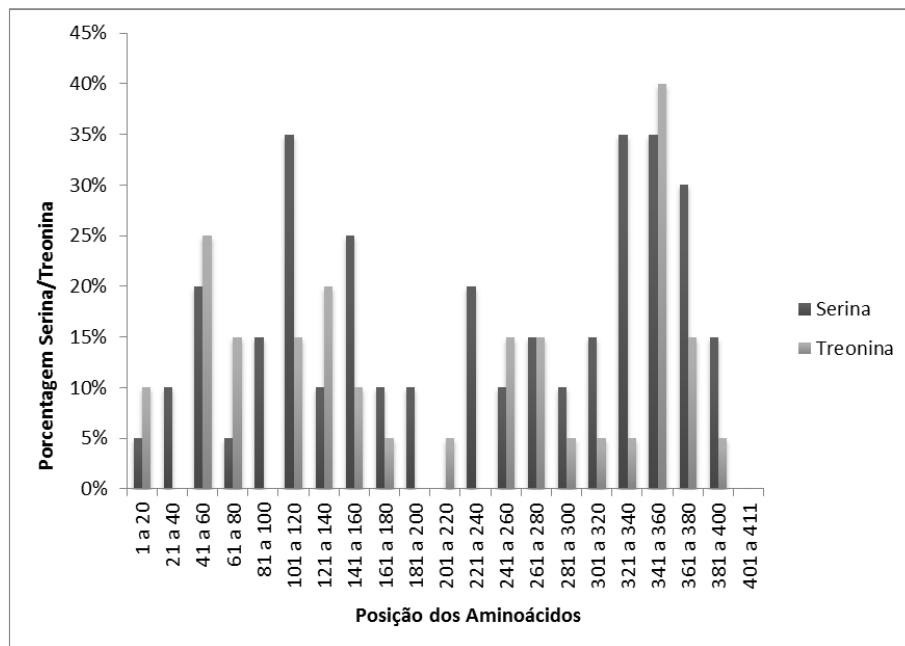


Figura 6. Análise de regiões ricas nos aminoácidos serina e treonina na proteína MP43 predita. A porcentagem de serina e treonina foi evidenciada a cada 20 aminoácidos da manoproteína MP43. A determinação foi realizada no software BioEdit.

4.3. Construção de *primers* para amplificação parcial da região codificadora de MP43

No intuito de facilitar o processo de secreção da manoproteína recombinante em *P. pastoris*, foram eliminadas as regiões referentes ao peptídeo sinal e à âncora de GPI da manoproteína MP43, correspondentes aos primeiros 60 nt e aos últimos 90 nt da região codificadora (Tabela 1). Foram adicionados aos *primers* sítios de clivagem para as enzimas EcoRI e BamHI, e uma região que codifica uma cauda de 6 histinas para purificação (Tabela 2).

Tabela 1. Modificações na sequência da região codificante da manoproteína MP43 de *C. gattii* para amplificação e clonagem em vetor de expressão.

MP43 (CNBG_4278) – 1.236 nucleotídeos

```

5'ATGCTCGCCGCCGCTCTCGCTTCTCTGCTCGCCACCATCGCGGTGAACGCCGTCACCT
GCGTCCAGTTGACTCGTCTTGGAACTTGTATGCTTTGGGGGTGACCAAGATGTAAAGATT
GGGGACAACAACACCTGGAGCTCCCGAGCAGACTCCCTTGTCTACCACTGGTCGCCCCC
GTGGACAGGAAACAATACCCAGTGTATTCTCTCCCAAACCAATAATGCTATGTACGTCATTGG
TGCCGACAGCGACGACTTGAGCAGCATCTACGTGTACGACTTTGCGGGTAATTCTGTGCTA
CTCAAAATACTTCAAGGACTCCTTACAGATCTCGGAAATTCTCGTTTCTAGCGTGTCTCGACC
ACGACACCAATGTATTCTTACCCTTACCACCGACTCCGGCCTTTACCAGCTTGATTTGAGCA
GCATCACAATTCTGCCTCAAGTGACACCCTCAGATGGGAGGCTGTTGAGAACCCAGCTTC
TCTGTGATGGCTACTTCGTCACTGCTGCGCAAGCTGCCAACCAATTTTTACTTTGGTGCG
CCTGGGGCCGCCAGTGGCTCTGCTTACATTTTCGTGGTGCCTACTTTCAGCCTAA

```

**GGCCCAGGCTTTCAATGGCACTGCATTCCCCGATGCTTCCGGCCAGGCCATCTCCATCCCCA
GCGCCGCGAACAATGTTCTTACTCGATGGTCTTCATTCCCTCATGACTTCTCCGATACCTACA
TTGTCACCCCTGGACTGATCTTAGTGACTATTCTGTCACTTCTGACGCTCCTTTTCGATGTTA
ATCTCATCAACTCTACTCAAACCTCTCCCCGCTCCTACGTCTCAAGACAAAGCTGCAGCTTATG
CCGCTTCTCCTTATGCCATCGTCCAAATTGACGCCGCTGGTGACATCTACTATATGTCGAGCC
CCGTCCAGTCCGACTACACCGTTTCATCTAGCGCGTCTTGGGAGAAGCTCGGCTACTCTCTG
ACTTTGAGCAAATCCAAGGACACTTCCTCATCTTCTACCACTTCTGGCACATCTACTACCACC
GGGGCCACCCATGGCTCTGCTTCTGGTACTGCCTCCCGCCCTGGCTCTACCGACAATGCCAG
CGCTTCTGCTAGTACCAATTCTAGCTCTGGGGCTAGGAGGATGGCCACCAGAGGTGATGTT
TGGGTCTCTTTGTGGGTGCCCTCGCCGCTGCTGCTGGTATCCTCATGTAA3’***

*As regiões em negrito e sublinhadas são referentes aos primeiros 60 nt (codificante do peptídeo sinal) e os últimos 90 nt (codificante da âncora de GPI) retirados.

Tabela 2. Primers para a amplificação da sequência codificadora de MP43 para expressão.

Primer	F	5’AAAAAGAATTCTGCGTCCAGTTGACTCG3’*
MP43		EcoRI
Primer	R	5’AAAAAGGATCCTTAATGGTGATGGTGATGGTGAGAATTGGTACTAGCAGA3’**
MP43		BamHI His-tag

* A região sublinhada da sequência do *primer direto* é referente ao sítio de clivagem da enzima EcoRI.

**A região sublinhada da sequência do *primer reverso* é referente ao sítio de clivagem da enzima BamHI, e a região em negrito é referente à cauda de histidina. Entre o sítio de clivagem e o tag de histidina há o stop códon TTA.

4.4. Análise preditiva de O-glicosilação

A análise foi realizada no algoritmo GlycoEP, selecionando opções de padrão de perfil binário e *threshold* igual à zero. O resultado está de acordo com a predição de que a região C-terminal da proteína rica nos aminoácidos serina e treonina é alvo potencial de O-glicosilação (Tabela 3).

Tabela 3. Predição de O-glicosilação pelo algoritmo GlycoEP.

Sequência codificadora de MP43 predita (CNBG_4278)

MLAAAALASLLATIAVNAVTCVQFDSSWNLYAFGGDQDVKIGDNNTWSSPSTIPLSTTGRPPWTG
NNTQCILSQTNNAMYVIGADSDDLSSIVYDFAGNSWSIQNTSRTI¹PSDLGNSR²SSVLDHDT³INVFFT
LTTDSGLYQLDLSSI⁴INSASSD⁵TLRWEAVENP⁶SFSVDGYFVTAAQAANHIF⁷YFGAPGAASG⁸SAYIFV
VHYAYFQPKAQAFNG⁹TAFPDASGQAISIPSAANNVPYSMV¹⁰FIPHDFSDTYIVTHWTDLS¹¹DYSV¹²TSDA
PFDVNLINS¹³TQTL¹⁴PAP¹⁵TSQDKAAAYAASPYAIVQIDAAGDIYYMSSPVQSDY¹⁶TVSSASWEKLGYSL
TLKSKD¹⁷TSSSSTTS¹⁸G¹⁹TSTTT²⁰GAT²¹HGS²²ASG²³TAS²⁴RPG²⁵ST²⁶DNAS²⁷SAS²⁸AST²⁹NS³⁰SS³¹GARRMA³²TRGDV³³LG

Sequência codificadora de MP43 utilizada para expressão

CVQFDSSWNLYAFGGDQDVKIGDNNTWSSPSTTPLSTTGRPPWTGNNTQCILSQTNNAMYVIGAD
 SDDLSSIYVYDFAGNSWSTQNTSRTPSDLGNSRSSSVLDHDTNVFFTLTTDSGLYQLDLSSIINSASS
 DTLRWEAVENPSFSVDGYFVTAAQAANHIFYFGAPGAASGSAYIFVVHYAYFQPKAQAFNGTAFP
 DASGQAISIPSAANNVPYSMVFIPHDFSDTYIVTHWTDLSDYSVTSAPFDVNLINSTQTLPAPTSQD
 KAAAYAASPYAIVQIDAAGDIYYMSSPVQSDYTVSSASWEKLGYSLTLKSKDTSSTSTSGTSTTT
 GATHGSASGTASRPGSTDNASASASTNS

*Os aminoácidos serina e treonina em vermelho são os possíveis sítios de O-glicosilação (score entre 0 e 0.99)

4.5. Análise da expressão de MP43 em condições de interação com o hospedeiro

A expressão do gene codificador de MP43 foi quantificada a partir da análise transcricional da interação de *C. gattii* linhagem R265 durante o processo de infecção em camundongos, e em condições de privação de zinco e cobre. Como resultado, observou-se um aumento significativo da expressão de MP43 durante a infecção em relação à diminuição da expressão na ausência dos micronutrientes (Figura 7). Este resultado indica que MP43 pode contribuir significativamente para o processo de interação com o hospedeiro, o que reforça a sua possível utilização em ensaios imunoterapêuticos para controle da criptococose.

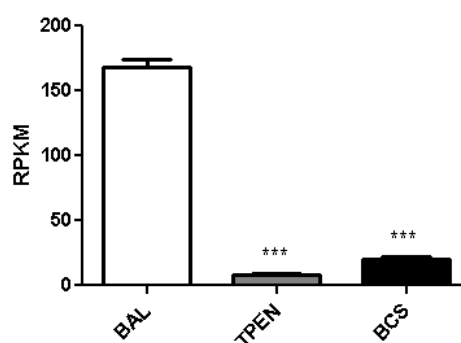


Figura 7. Níveis relativos de transcritos que codificam MP43 em condições de interação com o hospedeiro e na privação de micronutrientes. RPKM, número de *reads* mapeados da sequência de mRNA codificante de MP43 dividido pelo tamanho do transcrito, normalizados pelo número total de *reads* da amostra. BAL, lavado brônquio-alveolar. TPEN, quelante de zinco. BCS, quelante de cobre. *** $p < 0,0001$

4.6. Construção do plasmídeo recombinante

Para amplificação da região codificadora de MP43, foi extraído RNA de *C. gattii* linhagem R265 e, posteriormente, cDNA foi sintetizado. A região foi amplificada por PCR com os *primers* MP43F e MP43R (Figura 8A). Tanto o vetor utilizado para expressão, pHIL-S1 (Figura 8B), quanto o fragmento amplificado por PCR foram posteriormente digeridos com as enzimas EcoRI e BamHI. A reação de ligação foi realizada com a enzima T4 DNA

ligase, e o produto de ligação transformado em células de *E. coli*.

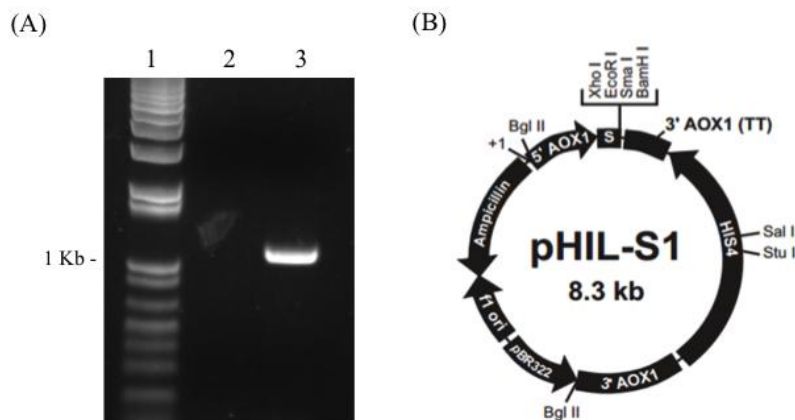


Figura 8. Amplificação da região codificadora de MP43 e clonagem no plasmídeo pHIL-S1. (A) PCR para amplificação da região codificadora de MP43 a partir do cDNA de *C. gattii* R265. Canaleta 1, marcador de tamanho molecular 1 kb plus DNA ladder. Canaleta 2, controle negativo. Canaleta 3, ORF MP43 de 1086 pb. (B) Mapa do plasmídeo pHIL-S1, o qual também foi clivado com ambas as enzimas para ligação. 5' AOX1, promotor induzível à metanol do gene codificador da enzima álcool oxidase. S, peptídeo sinal PHO1. 3' AOX1 TT, terminador do gene codificador da enzima álcool oxidase. HIS4, ORF *HIS4* para seleção auxotrófica. 3' AOX1, fragmento do gene codificador da enzima álcool oxidase. pBR322, origem de replicação para *E. coli*. F1 ori, origem de bacteriófago. *Ampicilin*, gene de resistência ao antibiótico ampicilina.

4.7. Confirmação da construção do plasmídeo recombinente

Após a transformação do vetor em células de *E. coli* TOP10F', foi extraído DNA plasmidial e a confirmação da construção foi realizada pela digestão do vetor com a enzima BglIII. A clivagem com essa enzima gerou três fragmentos de DNA de tamanho esperado: 5183 pb, 2868 pb e 1291 pb (Figura 9). Também foi realizado o sequenciamento do inserto com os *primers* MP43F e MP43R. Esta análise evidenciou apenas a troca de uma timina por uma adenina na terceira posição da sequência corresponde ao códon GCU (posição 1066), porém esta substituição não gera alteração no aminoácido correspondente, permanecendo um resíduo de alanina nesta posição (Tabela 4).

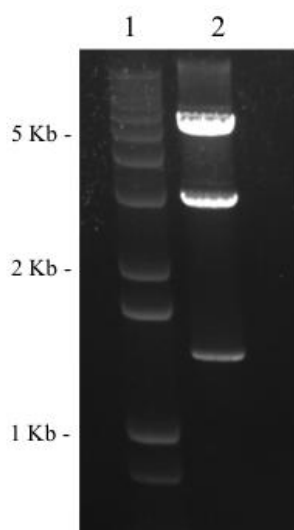


Figura 9. Confirmação da clonagem da região codificadora de MP43 no vetor de expressão pPHIL-S1 por clivagem. O vetor pPHIL-S1_MP43 foi clivado com a enzima BglII, gerando fragmentos de 5183 pb, 2868 pb e 1291 pb. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular 1 kb plus DNA ladder; Canaleta 2: vetor pPHIL-S1_MP43 clivado.

Tabela 4. Confirmação da clonagem da região codificadora de MP43 no vetor de expressão pPHIL-S1 por sequenciamento.

Query= Seq_CNBG_4278 / Length=1086 Sbjct: sequencing	
Score = 2001 bits (1083), Expect = 0.0, Identities = 1085/1086 (99%), Gaps = 0/1086 (0%)	
Query	1 TCGCTCCAGTTTGACTCGTCTTGGAACTTGTATGCCTTTGGGGGTGACCAAGATGTAAAG 60
Sbjct	1 TCGCTCCAGTTTGACTCGTCTTGGAACTTGTATGCCTTTGGGGGTGACCAAGATGTAAAG 60
Query	61 ATTGGGGACAACAACACCTGGAGCTCCCCGAGCAGACTCCCTTGTCTACCACTGGTCGC 120
Sbjct	61 ATTGGGGACAACAACACCTGGAGCTCCCCGAGCAGACTCCCTTGTCTACCACTGGTCGC 120
Query	121 CCCCCGTGGACAGGAAACAATACCCAGTGTATTCTCTCCCAAACCAATAATGCTATGTAC 180
Sbjct	121 CCCCCGTGGACAGGAAACAATACCCAGTGTATTCTCTCCCAAACCAATAATGCTATGTAC 180
Query	181 GTCATTGGTGCCGACAGCGACGACTTGAGCAGCATCTACGTGTACGACTTTGCGGGTAAT 240
Sbjct	181 GTCATTGGTGCCGACAGCGACGACTTGAGCAGCATCTACGTGTACGACTTTGCGGGTAAT 240
Query	241 TCCTGGTCTACTCAAATACTTCAAGGACTCCTTCAGATCTCGGAAATTCTCGTTCATCT 300
Sbjct	241 TCCTGGTCTACTCAAATACTTCAAGGACTCCTTCAGATCTCGGAAATTCTCGTTCATCT 300
Query	301 AGCGTGCTCGACCACGACACCAATGTATTCTTCACCCTTACCACCGACTCCGGCCTTTAC 360
Sbjct	301 AGCGTGCTCGACCACGACACCAATGTATTCTTCACCCTTACCACCGACTCCGGCCTTTAC 360

Query	361	CAGCTTGATTTGAGCAGCATCACAAATTCGCCTCAAGTGACACCCCTCAGATGGGAGGCT	420
Sbjct	361	CAGCTTGATTTGAGCAGCATCACAAATTCGCCTCAAGTGACACCCCTCAGATGGGAGGCT	420
Query	421	GTTGAGAACCCAGCTTCTGTGCGATGGCTACTTCGTCACTGCTGCGCAAGCTGCCAAC	480
Sbjct	421	GTTGAGAACCCAGCTTCTGTGCGATGGCTACTTCGTCACTGCTGCGCAAGCTGCCAAC	480
Query	481	CACATTTTTACTTTGGTGCCTGGGGCCGAGTGGCTCTGCTTACATTTTTCGTGGTG	540
Sbjct	481	CACATTTTTACTTTGGTGCCTGGGGCCGAGTGGCTCTGCTTACATTTTTCGTGGTG	540
Query	541	CACTACGCCTACTTTCAGCCTAAGGCCAGGCTTCAATGGCACTGCATTCCCCGATGCT	600
Sbjct	541	CACTACGCCTACTTTCAGCCTAAGGCCAGGCTTCAATGGCACTGCATTCCCCGATGCT	600
Query	601	TCCGGCCAGGCCATCTCCATCCCAGCGCCGGAACAATGTTCCCTTACTCGATGGTCTTC	660
Sbjct	601	TCCGGCCAGGCCATCTCCATCCCAGCGCCGGAACAATGTTCCCTTACTCGATGGTCTTC	660
Query	661	ATTCCTCATGACTTCTCCGATACTACATTGTCACCCACTGGACTGATCTTAGTGACTAT	720
Sbjct	661	ATTCCTCATGACTTCTCCGATACTACATTGTCACCCACTGGACTGATCTTAGTGACTAT	720
Query	721	TCTGTCACTTCTGACGCTCCTTTCGATGTTAATCTCATCAACTCTACTCAAACCTCCTCCC	780
Sbjct	721	TCTGTCACTTCTGACGCTCCTTTCGATGTTAATCTCATCAACTCTACTCAAACCTCCTCCC	780
Query	781	GTCCTACGTCTCAAGACAAAGCTGCAGCTTATGCCGCTTCTCCTTATGCCATCGTCCAA	840
Sbjct	781	GTCCTACGTCTCAAGACAAAGCTGCAGCTTATGCCGCTTCTCCTTATGCCATCGTCCAA	840
Query	841	ATTGACCCGCTGGTGACATCTACTATATGTCGAGCCCGTCCAGTCCGACTACACCGTT	900
Sbjct	841	ATTGACCCGCTGGTGACATCTACTATATGTCGAGCCCGTCCAGTCCGACTACACCGTT	900
Query	901	TCATCTAGCGCGTCTTGGGAGAAGCTCGGCTACTCTCTGACTTTGAGCAAATCCAAGGAC	960
Sbjct	901	TCATCTAGCGCGTCTTGGGAGAAGCTCGGCTACTCTCTGACTTTGAGCAAATCCAAGGAC	960
Query	961	ACTTCTCATCTTCTACCACTTCTGGCACATCTACTACCACGGGGCCACCCATGGCTCT	1020
Sbjct	961	ACTTCTCATCTTCTACCACTTCTGGCACATCTACTACCACGGGGCCACCCATGGCTCT	1020
Query	1021	GCTTCTGGTACTGCCTCCCGCCCTGGCTCTACCGACAATGCCAGCGCTTCTGCTAGTACC	1080
Sbjct	1021	GCTTCTGGTACTGCCTCCCGCCCTGGCTCTACCGACAATGCCAGCGCTTCTGCTAGTACC	1080
Query	1081	AATTCT 1086	
Sbjct	1081	AATTCT 1086	

4.8. Transformação em *P. pastoris*

Para a inserção do vetor de expressão pHIL-S1_MP43 no genoma da levedura, o mesmo foi clivado com a enzima SalI para linearização (Figura 10A). Realizamos uma eletroporação com células competentes das linhagens KM71 e GS115 de *P. pastoris*. As linhagens mutantes foram selecionadas em meio de cultura sem histidina, pois é esperado que haja recombinação homóloga entre as sequências do gene *HIS4* e o locus *his4* e consequente reconstituição do fenótipo. No primeiro evento de transformação, foi possível recuperar duas colônias transformantes de cada linhagem transformada, sendo a inserção confirmada por PCR com *primers* MP43F e MP43R (Figura 10B).

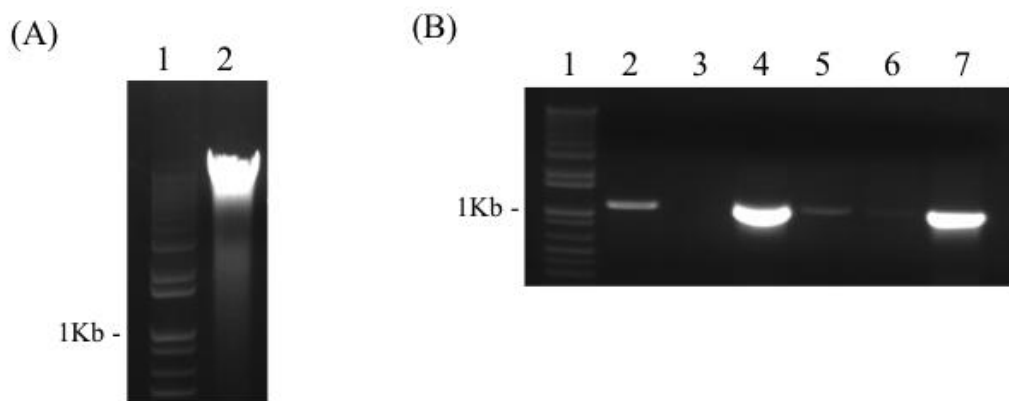


Figura 10. Transformação do plasmídeo recombinante pHIL-S1_MP43 em *P. pastoris* linhagens KM71 e GS115. (A) Linearização do vetor pHIL-S1_MP43 com a enzima de restrição SalI. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular 1 kb plus DNA ladder; Canaleta 2: produto de clivagem. (B) Região codificadora de MP43 amplificada a partir de PCR do DNA genômico das quatro linhagens de *P. pastoris* transformantes. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular 1 kb plus DNA ladder; Canaleta 2: controle positivo (cDNA *C. gattii* R265); Canaleta 3: controle negativo; Canaleta 4: GS115-1; Canaleta 5: GS115-2; Canaleta 6: KM71-1; Canaleta 7: KM71-2.

4.9. Expressão heteróloga de albumina em *P. pastoris* para otimização das condições de cultivo e expressão

Anteriormente à realização da expressão da manoproteína MP43 nas quatro linhagens transformantes de *P. pastoris*, foi padronizada a expressão da proteína albumina com a linhagem controle GS115-Albumina. Foram testados três meios diferentes com glicerol como fonte de carbono (MD, BMG e BMGY) e três meios diferentes para indução com metanol como fonte de carbono (MM, BMM e BMMY). Após a quantificação por Bradford do

sobrenadante de cada indução, do tempo 0 até 144 h, o melhor resultado de indução da expressão da proteína albumina obtido foi com os meios BMGY e BMMY. Foi precipitada uma alíquota do sobrenadante destas condições com TCA 10%, e após foi realizada uma análise por eletroforese em gel SDS-PAGE (Figura 11).

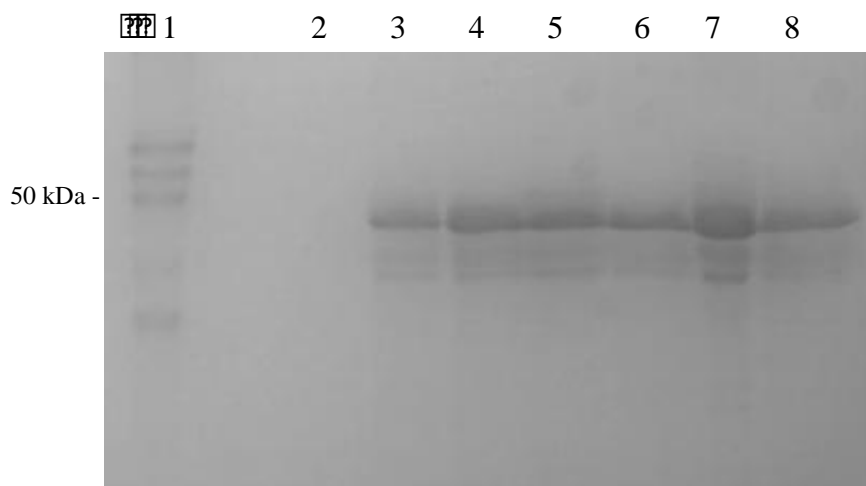


Figura 11. Indução da expressão da proteína albumina na linhagem controle GS115-Alb de *P. pastoris*. A indução da expressão da albumina foi realizada em meio BMMY durante 144 h, adicionando 0,5% v/v de metanol a cada 24 h. Foram precipitados 200 μ L do sobrenadante com TCA 10% e a análise foi realizada por eletroforese em gel SDS-PAGE. Canaleta 1: marcador de massa molecular *Prestained Molecular Weight Marker* (Sigma-Aldrich); Canaleta 2: tempo 0 h; Canaleta 3: tempo 24 h; Canaleta 4: tempo 48 h; Canaleta 5: tempo 72 h; Canaleta 6: tempo 96 h; Canaleta 7: tempo 120 h; Canaleta 8: tempo 144 h.

A banda referente à albumina observada no gel não correspondeu sua massa molecular predita de 67 kDa. Desta forma, tal região foi excisada do gel e submetida à análise por espectrometria de massas, cuja cobertura obtida foi de 8%, o número de peptídeos identificados foi quatro e o *score* 23. O gene identificado foi *ALB*, sendo descrito como isoforma 1 do precursor da albumina sérica.

4.10. Expressão heteróloga de MP43 em *P. pastoris*

Após um primeiro teste de indução da expressão com os quatro transformantes de *P. pastoris* obtidos (GS115-1, GS115-2, KM71-1 e KM71-2), o transformante que apresentou a maior concentração de proteínas no sobrenadante determinada pelo método de Bradford foi GS115-1. Foram precipitados 500 μ L deste sobrenadante com TCA 10% e foi realizada uma análise por eletroforese em gel SDS-PAGE com todos os tempos de indução analisados (0 a

144 h). Pode-se visualizar uma banda majoritária de massa menor do que 30 kDa, porém a massa predita da manoproteína MP43 após as modificações realizadas para clonagem corresponde a 39 kDa (Figura 12). É importante ressaltar que esta predição não leva em consideração as modificações pós-traducionais de glicosilação, que certamente influenciam a massa da proteína madura.

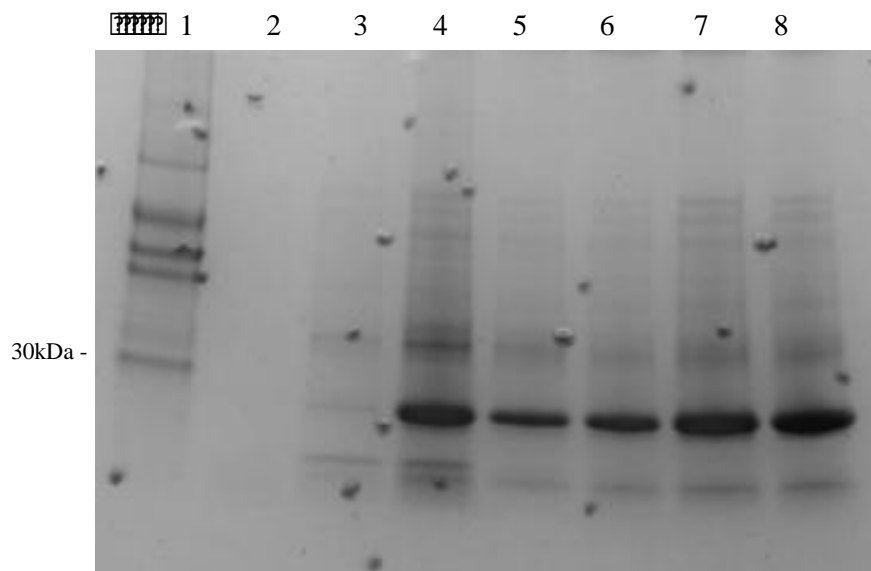


Figura 12. Indução da expressão da manoproteína MP43 utilizando a linhagem GS115-1 de *P. pastoris*. A indução da expressão da MP43 foi realizada no meio de cultivo BMMY durante 144 h, adicionando 0,5% v/v de metanol a cada 24 h. A análise das amostras foi realizada por eletroforese em gel SDS-PAGE. Canaleta 1: marcador de massa molecular *Prestained Molecular Weight Marker* (Sigma-Aldrich); Canaleta 2: tempo 0 h; Canaleta 3: tempo 24 h; Canaleta 4: tempo 48 h; Canaleta 5: tempo 72 h; Canaleta 6: tempo 96 h; Canaleta 7: tempo 120 h; Canaleta 8: tempo 144 h.

Após esse primeiro teste de indução, várias tentativas de escalonamento para cultivos maiores foram realizadas, tanto com a linhagem GS115-1 quanto com as outras três, porém não foram obtidos resultados satisfatórios. Por isto, realizamos ainda um teste de indução posterior utilizando a concentração de 0,8% v/v de metanol para indução (Figuras 13A e 13B).

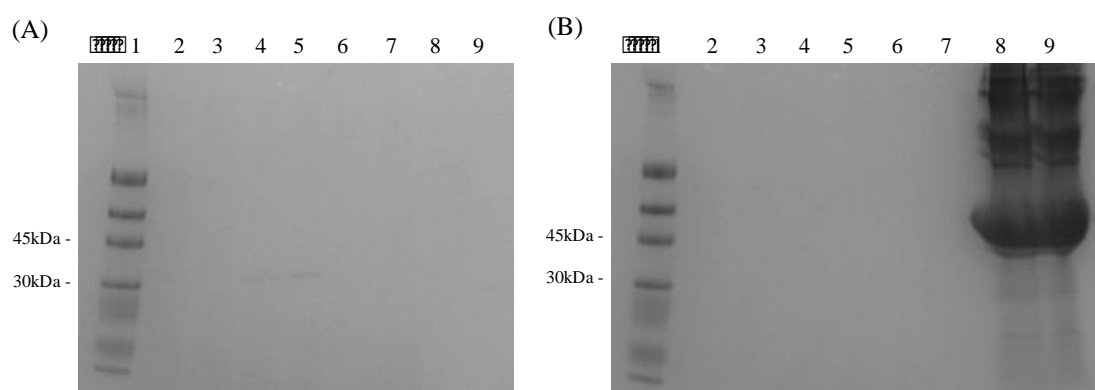


Figura 13. Testes de indução da expressão da manoproteína MP43 com os transformantes KM71-1, KM71-2, GS115-1 e GS115-2 de *P. pastoris*. (A) Indução da expressão da MP43 com quatro linhagens transformantes de *P. pastoris*. Foram concentrados 500 μ L do sobrenadante dos tempos de 120 e 144 h em *SpeedVac*. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE. Canaleta 1: marcador de massa molecular *ColorBurst* (Sigma-Aldrich); Canaleta 2: KM71-1 tempo 120 h; Canaleta 3: KM71-1 tempo 144 h; Canaleta 4: KM71-2 tempo 120 h; Canaleta 5: KM71-2 tempo 144 h; Canaleta 6: GS115-1 tempo 120 h; Canaleta 7: GS115-1 tempo 144 h; Canaleta 8: GS115-2 tempo 120 h; Canaleta 9: GS115-2 tempo 144 h. (B) Indução da expressão da MP43 com as linhagens GS115-1, GS115-2 e KM71-2 de *P. pastoris* com 0,5% v/v ou 0,8% v/v de metanol. Foram precipitados 500 μ L do sobrenadante dos cultivos com TCA 10%. Canaleta 1: marcador de massa molecular *ColorBurst* (Sigma-Aldrich); Canaleta 2: GS115-1, tempo 144 h, 0,5% v/v metanol; Canaleta 3: GS115-1, tempo 144 h, 0,8% v/v metanol; Canaleta 4: KM71-2, tempo 144 h, 0,5% v/v metanol; Canaleta 5: KM71-2, tempo 144 h, 0,8% v/v metanol; Canaleta 6: GS115-2, tempo 144 h, 0,5% v/v metanol; Canaleta 7: GS115-2, tempo 144 h, 0,8% v/v metanol; Canaleta 8: GS115-Albumina, tempo 120 h, 0,5% v/v metanol; Canaleta 9: GS115-Albumina, tempo 144 h, 0,5% v/v metanol.

Para verificar se a manoproteína estava sendo expressa, porém não secretada para o meio de cultivo, as células das linhagens GS115-1, GS115-2 e KM71-2 foram lisadas após 144 h de indução com 0,5% e 0,8% v/v de metanol, entretanto a manoproteína MP43 não foi detectada no sobrenadante do lisado celular em nenhum dos transformantes analisados (Figura 14). Posteriormente, extraímos novamente DNA genômico das quatro linhagens para reconfirmação da presença do gene de interesse por PCR, utilizando os *primers* MP43F e MP43R. A região codificadora de MP43 na linhagem GS115-1 não foi amplificada, o que não ocorreu para as outras linhagens analisadas (Figura 15).

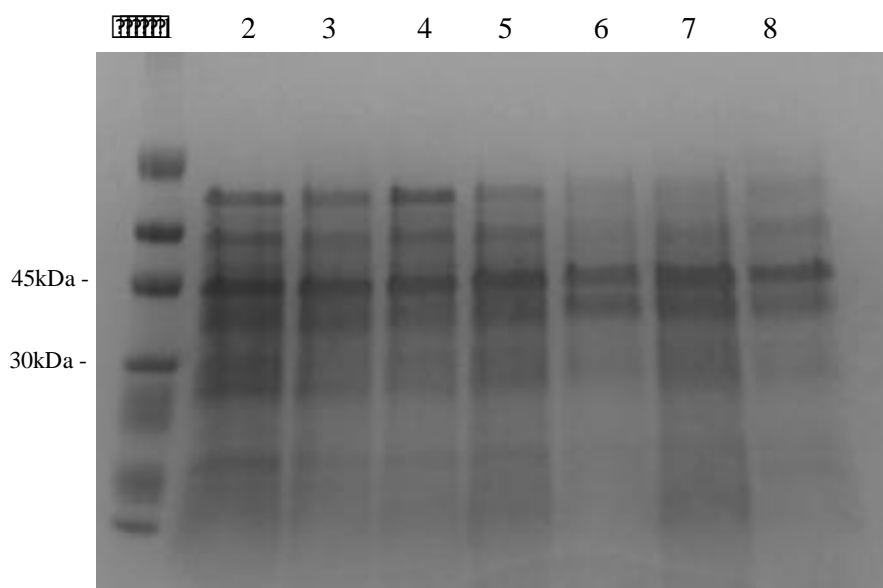


Figura 14. Análise de proteínas intracelulares das linhagens GS115-1, GS115-2 e KM71-2 de *P. pastoris* após 144 horas de indução. Após 144 h de indução com 0,5% e 0,8% v/v de metanol, as células das linhagens de *P. pastoris* foram lisadas e seus perfis proteicos analisados por eletroforese em gel SDS-PAGE. Canaleta 1: marcador de massa molecular *ColorBurst* (Sigma-Aldrich); Canaleta 2: GS115-1, 0,5% v/v metanol; Canaleta 3: GS115-1, 0,8% v/v metanol; Canaleta 4: GS115-2, 0,5% v/v metanol; Canaleta 5: GS115-2, 0,8% v/v metanol; Canaleta 6: KM71-2, 0,5% v/v metanol; Canaleta 7: KM71-2, 0,8% v/v metanol; Canaleta 8: GS115-Albumina 0,5% v/v metanol.

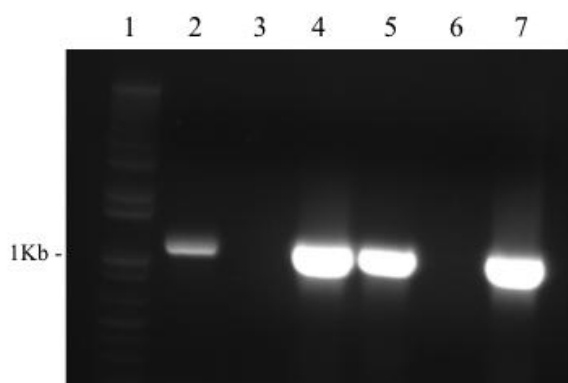


Figura 15. PCR para amplificação da região codificadora de MP43 em quatro linhagens transformantes de *P. pastoris*. PCR utilizando como molde DNA genômico das linhagens KM71-1, KM71-2, GS115-1 e GS115-2 extraído após todos os testes de indução da expressão da manoproteína MP43 com metanol. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular 1 kb plus DNA ladder, indicado em kb; Canaleta 2: controle positivo (cDNA de *C. gattii* R265); Canaleta 3: controle negativo; Canaleta 4: KM71-1; Canaleta 5: KM71-2; Canaleta 6: GS115-1; Canaleta 7: GS115-2.

Devido a estes resultados, foi realizada uma nova transformação do vetor de expressão pHIL-S1_MP43 em novas células eletrocompetentes das linhagens GS115 e KM71 de *P. pastoris*. A construção foi conferida novamente pela clivagem com a enzima BglII como descrito anteriormente e também foi linearizada com a enzima de restrição SalI. O vetor linearizado foi transformado e as células de *P. pastoris* que receberam a construção foram selecionadas em meio sem histidina. Foram obtidos 124 transformantes, 64 da linhagem KM71 e 60 da GS115. Foi realizado um teste inicial de indução em tubos cônicos de 50 ml com 7 transformantes da linhagem GS115, 6 transformantes da linhagem KM71 e, como controle, a linhagem GS115-Albumina durante 144 h, adicionando 0,5% v/v de metanol a cada 24 h. Após a quantificação do sobrenadante dos 13 transformantes testados, os que apresentaram a maior concentração de proteínas tiveram todo o sobrenadante precipitado com TCA 10%. Foi realizada uma análise por eletroforese em gel SDS-PAGE com estas amostras, porém não houve indução da manoproteína MP43 em nenhum dos transformantes testados (Figura 16).

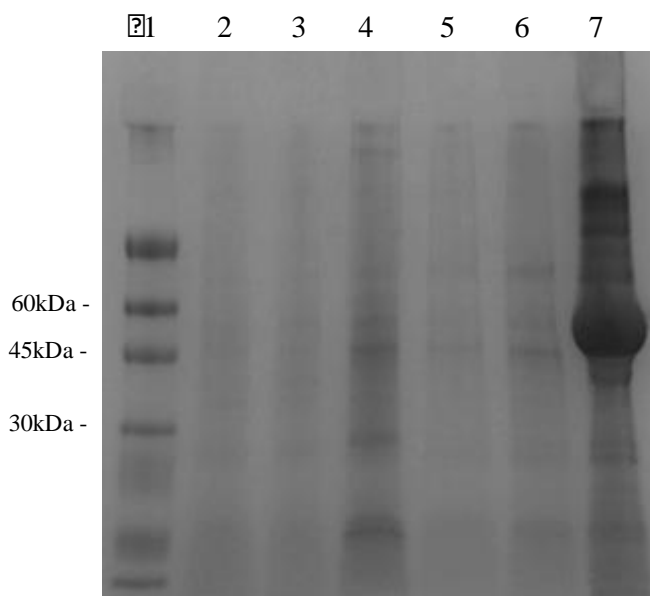


Figura 16. Indução da expressão de MP43 com os novos transformantes KM71-2, KM71-4, KM71-5, GS115-4 e GS115-6 de *P. pastoris*. A indução da expressão de MP43 recombinante utilizando os novos transformantes foi realizada em tubos cônicos de 50 ml, sendo todo o conteúdo dos sobrenadantes precipitado após 144 h de indução. Canaleta 1: marcador de massa molecular *ColorBurst* (Sigma-Aldrich); Canaleta 2: KM71-2; Canaleta 3: KM71-4; Canaleta 4: KM71-5; Canaleta 5: GS115-4; Canaleta 6: GS115-6; Canaleta 7: GS115-Albumina.

Foi realizada a lise celular dos mesmos transformantes testados para avaliação das proteínas intracelulares. Adicionalmente, analisamos o precipitado das células obtido após o procedimento de lise, para avaliar se a manoproteína MP43 recombinante estava associada à parede celular de *P. pastoris*. No extrato proteico proveniente do citoplasma da célula, não foi possível detectar a MP43 recombinante (Figura 17A), porém no tratamento do precipitado de células após a lise, foi possível visualizar uma banda de massa molecular entre 60 e 100 kDa nos transformantes GS115-4 e GS115-6, que diferem do padrão proteico da linhagem controle (GS115-Albumina) (Figura 17B). Este resultado indica que a manoproteína MP43 recombinante está sendo expressa, entretanto não está sendo devidamente secretada para o meio extracelular. Para confirmar se as proteínas identificadas nos extratos de parede das linhagens GS115-4 e GS115-6 tratavam-se de glicoproteínas, uma análise por eletroforese em gel SDS-PAGE foi realizada e o gel corado com soluções do kit *Glycoprotein Detection Kit* (Sigma-Aldrich). Esta análise permitiu a detecção de uma glicoproteína recombinante de massa molecular próxima a 100 KDa, fato possivelmente associado ao aumento de massa em função de glicosilação. Esta proteína não foi detectada em extratos processados da linhagem controle GS115-Albumina (Figura 18).

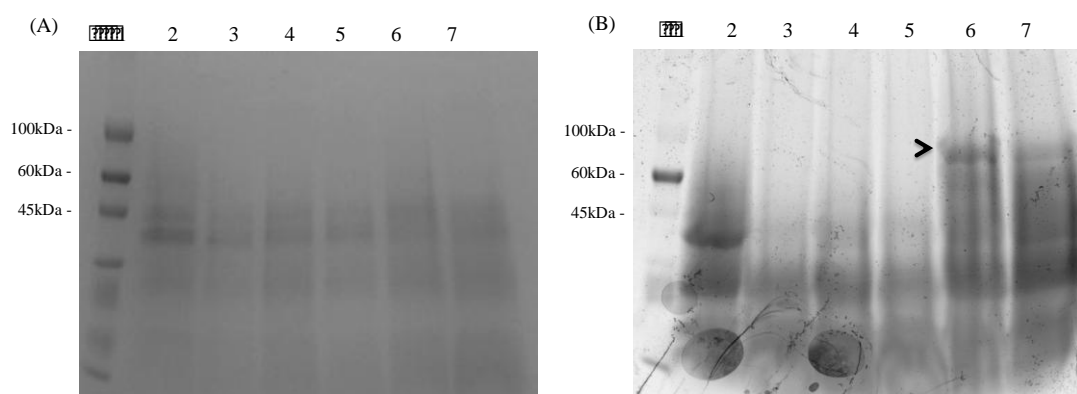


Figura 17. Análise de proteínas intracelulares e associadas à parede celular nos transformantes KM71-2, KM71-4, KM71-5, GS115-4 e GS115-6 de *P. pastoris*. Após 144 h de indução com 0,5% v/v de metanol, as células das linhagens de *P. pastoris* foram lisadas e seus perfis proteicos analisados por eletroforese em GEL SDS-PAGE. (A) proteínas citoplasmáticas (B) proteínas covalentemente ligadas à parede celular. Canaleta 1: marcador de massa molecular *ColorBurst* (Sigma-Aldrich); Canaleta 2: GS115-Albumina; Canaleta 3: KM71-2; Canaleta 4: KM71-4; Canaleta 5: KM71-5; Canaleta 6: GS115-4; Canaleta 7: GS115-6. A seta indica a proteína de aproximadamente 100 kDa identificada no extrato proteico das linhagens transformantes.

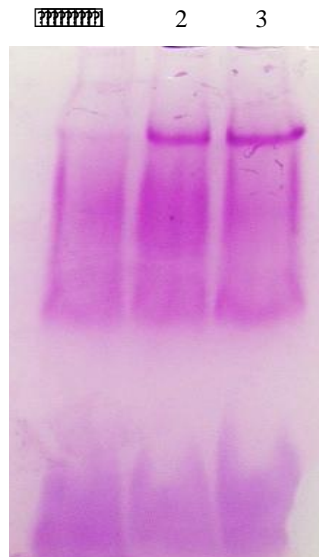


Figura 18. Análise da presença de glicoproteínas em extratos proteicos dos transformantes GS115-4 e GS115-6 de *P. pastoris*. Após eletroforese, o gel SDS-PAGE foi corado com soluções específicas do kit *Glycoprotein Detection Kit* (Sigma-Aldrich). Canaleta 1: GS115-Albumina, controle; Canaleta 2: GS115-4; Canaleta 3: GS115-6.

5. DISCUSSÃO

A criptococose é uma doença considerada oportunista, quando causada por *C. neoformans*, ou primária, quando causada por *C. gattii*. O Rio Grande do Sul é o segundo Estado do Brasil com maior incidência de casos de infecção pelas leveduras patogênicas do gênero *Cryptococcus*, principalmente pela alta incidência de pacientes também infectados pelo vírus HIV (SES-CEVS-TABNET). Os tratamentos convencionais da criptococose incluem a utilização de antifúngicos, como fluconazol, anfotericina B e flucitosina, ou a combinação dos mesmos, para aumento da eficácia. Devido à alta toxicidade dos antifúngicos, principalmente aos pacientes já imunocomprometidos, os tratamentos alternativos buscam combinar antifúngicos convencionais com novos compostos. Esses novos compostos podem ser moléculas naturais com atividade fungicida ou fungistática extraídas de plantas como *Dimocarpus longan*, *Hypericum perforatum* e *Maytenus ilicifolia*, ou podem ser citocinas e anticorpos monoclonais. A administração de IL-12 em modelo murino de criptococose aumenta a infiltração de linfócitos, ativa a via do complemento, aumenta a secreção de INF- γ pelas células NK e linfócitos do sistema imune do hospedeiro, diminuindo o desenvolvimento das leveduras patogênicas do gênero *Cryptococcus* (Gullo *et al.*, 2013). Os anticorpos monoclonais são responsáveis pela opsonização do patógeno, levando ao aumento da resposta inflamatória e fagocitose pelas células do sistema imune inato.

O único anticorpo monoclonal utilizado até agora no tratamento da criptococose em seres humanos foi o anticorpo 18B7, reconhecedor de moléculas de GXM da cápsula de *Cryptococcus*. A terapia realizada em pacientes portadores do vírus HIV evidenciou a toxicidade do tratamento com concentrações do anticorpo próximas a 2 mg/kg, mas também evidenciou sua eficiência como fungicida e a falta de efeitos colaterais em doses abaixo de 1 mg/kg (Larsen *et al.*, 2005). O reconhecimento do patógeno por anticorpos, não apenas monoclonais, é capaz de diminuir seu desenvolvimento sem o envolvimento de outras células do sistema imune, por causar mudanças na expressão gênica e em algumas estruturas celulares do patógeno. Em *C. neoformans*, o tratamento com o anticorpo 18B7 foi capaz de modificar a estrutura da membrana celular do fungo e aumentar a expressão de genes relacionados à síntese de lipídeos, principalmente de ergosterol. Sua administração potencializou a atividade antifúngica de anfotericina B (Janoff e Frank, 2010). O tratamento da criptococose em modelo murino de infecção de *C. neoformans* com 18B7 conjugado a moléculas radioativas foi capaz de eliminar toda a carga fúngica do pulmão e do cérebro dos camundongos (Jiang *et al.*, 2012).

As manoproteínas, por serem altamente glicosiladas, são reconhecidas por receptores de lectina e de manose pelas células dendríticas e macrófagos do hospedeiro, principalmente. Através desse reconhecimento, pode-se induzir resposta imune protetora, com secreção de TNF- α , INF- γ e IL-12 e ativação de linfócitos Th1 ou induzir resposta imune não protetora, com secreção IL-4 e IL-13 e ativação de linfócitos Th2. As manoproteínas de *C. neoformans* são capazes de promover a maturação de células dendríticas e de ativar tanto linfócitos T CD4+ quanto T CD8+ *in vitro* (Pietrella *et al.*, 2005). Levando em consideração que a resposta imune humoral é importante para o combate e proteção contra patógenos e que a habilidade de *C. gattii* de infectar pacientes imunocompetentes possa estar relacionada à dificuldade de maturação de células dendríticas do hospedeiro, há um grande suporte para utilização das manoproteínas como potenciais candidatas à imunoterapia para tratamento da criptococose (Mansour, *et al.*, 2002; Heitman e American Society for Microbiology., 2011).

Todos os estudos de função, localização e imunogenicidade de manoproteínas descritas na literatura atualmente são provenientes de *C. neoformans*, não ocorrendo nenhuma descrição sobre as mesmas em *C. gattii*. A caracterização da MP98 de *C. neoformans* foi realizada através da expressão heteróloga em *E. coli*, modelo onde não ocorre a glicosilação, e *P. pastoris*, modelo com glicosilação. A mesma modificação que realizamos na sequência codificante de MP43 para clonagem foi realizada para a expressão recombinante de MP98 de *C. neoformans*, incluindo a eliminação do peptídeo sinal, do sítio de ancoramento à GPI e adição de uma cauda de histidinas, em vista da alta imunogenicidade relacionada à âncora de GPI e de facilitar o processo de purificação. A manoproteína MP98 expressa em *E. coli* não foi capaz de elicitar resposta imune de células T em modelo murino de infecção, enquanto a expressa em *P. pastoris* foi, mostrando que a glicosilação é essencial para a imunogenicidade das manoproteínas (Specht *et al.*, 2007).

A escolha de *P. pastoris* como modelo de expressão da manoproteína MP43 recombinante foi baseada na sua eficiência nos processos de modificações pós-traducionais como a glicosilação de proteínas e dobramento, na sua taxa de crescimento elevada, fácil manipulação e na presença do forte promotor AOX1 induzível por metanol. *P. pastoris* é considerada um bom modelo de expressão devido à elevada taxa de recombinação homóloga, principalmente no *locus his4* e AOX1. Dos primeiros quatro transformantes analisados, em apenas um da linhagem GS115 foi possível visualizar algum produto de expressão, porém a proteína apresentava massa menor do que 30 kDa, podendo ser um possível resultado de

clivagem proteica, uma vez que *P. pastoris* secreta proteases (De Schutter *et al.*, 2009), ou problemas na secreção envolvendo o peptídeo sinal *PHO1*.

Após algumas tentativas de indução da expressão sem sucesso, foi realizado PCR com o DNA genômico dos transformantes para amplificação da região codificadora de MP43 e, na única linhagem em que detectamos algum possível produto de expressão, a região codificadora não foi amplificada. A perda de região codificadora de MP43 pode ter ocorrido durante o processo de indução com metanol, pois já foi relatado na literatura que após 96 h de indução, linhagens com múltiplas cópias do gene de interesse perderam mais de 10 cópias do mesmo após a indução tanto em menor escala quanto em fermentador (Zhu *et al.*, 2009). Repiques consecutivos em YDP, meio rico não seletivo, não influenciam na instabilidade genômica e linhagens de *P. pastoris* com poucas cópias do gene de interesse são estáveis após a indução com metanol (Ohi *et al.*, 1998).

Após a análise de novos transformantes e a análise de proteínas possivelmente associadas à parede celular, foi possível visualizar uma proteína com massa molecular próxima a 100 kDa nos transformantes GS115-4 e GS115-6. A massa molecular predita da manoproteína MP43 é de aproximadamente 43 kDa, sem considerarmos o aumento da massa em decorrência da glicosilação. A manoproteína MP98 de *C. neoformans* apresenta massa predita *in silico* de 48 kDa, correspondente apenas a sequência de aminoácidos, mas a proteína madura glicosilada apresenta massa de 98 kDa (Specht *et al.*, 2007), o que representa um aumento de 50 kDa na massa total em função destas modificações pós-traducionais. Devido o grande aumento da massa molecular de proteínas que são altamente glicosiladas, é provável que a proteína de aproximadamente 100 kDa visualizada após a extração de proteínas associadas à parede celular de *P. pastoris* GS115-4 e GS115-6 seja a MP43 recombinante.

Os dados obtidos até o momento apontam para uma possível associação da manoproteína recombinante com a parede celular de células de *P. pastoris*, o que indica uma falha no processo de secreção. Protocolos de extração de proteínas associadas à parede deverão ser otimizados no intuito de obter concentrações suficientes de proteína para posterior purificação. Após a conclusão destas etapas, a proteína recombinante purificada será utilizada em ensaios de infecção experimental em camundongos com o intuito de verificar o potencial imunogênico desta proteína no controle da criptococose.

6. CONCLUSÕES

- A manoproteína MP43 de *C. gattii* apresenta região C-terminal rica nos aminoácidos serina e treonina, potencial sítio de glicosilação;

- MP43 é diferencialmente expressa em condições de interação com o hospedeiro murino, reforçando a sua possível utilização em ensaios imunoterapêuticos para controle da criptococose;

7. PERSPECTIVAS

- Confirmação da expressão da proteína MP43 de *C. gattii* em *P. pastoris* por espectrometria de massas;
- Purificação da manoproteína recombinante MP43;
- Avaliação do potencial imunoterapêutico da manoproteína recombinante em modelo murino de criptococose.

8. REFERÊNCIAS

ANTACHOPOULOS, C.; WALSH, T. J. Immunotherapy of *Cryptococcus* infections. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 2, p. 126-33, Feb 2012. ISSN 1469-0691. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22264261>>.

BATES, S. et al. *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase, is required for glycosylation and virulence. **J Biol Chem**, v. 280, n. 24, p. 23408-15, Jun 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15843378>>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72: 248-254, 1976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>>.

BRETTTHAUER, R. K.; CASTELLINO, F. J. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 30 (Pt 3), p. 193-200, Dec 1999. ISSN 0885-4513. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10574687>>.

BYRNES, E. J. et al. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 4, p. e1000850, Apr 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421942>>.

BYRNES, E. J. et al. A diverse population of *Cryptococcus gattii* molecular type VGIII in southern Californian HIV/AIDS patients. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 9, p. e1002205, Sep 2011. ISSN 1553-7374. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21909264>>.

CADIEUX, B. et al. The Mannoprotein Cig1 supports iron acquisition from heme and virulence in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **J Infect Dis**, v. 207, n. 8, p. 1339-47, Apr 2013. ISSN 1537-6613. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23322859>>.

CASALI, A. K. et al. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Res**, v. 3, n. 4, p. 405-15, Jun 2003. ISSN 1567-1356. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12748052>>.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The Tools for Virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, v. 87, p. 1-41, 2014. ISSN 0065-2164. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24581388>>.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica (Cairo)**, v. 2013, p. 675213, 2013. ISSN 2090-908X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24278784>>.

COX, G. M. et al. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infect Immun**, v. 68, n. 2, p. 443-8, Feb 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10639402>>.

DALY, R.; HEARN, M. T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **J Mol Recognit**, v. 18, n. 2, p. 119-38, 2005 Mar-Apr 2005. ISSN 0952-3499. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15565717>>.

DATTA, K.; BARTLETT, K. H.; MARR, K. A. *Cryptococcus gattii*: Emergence in Western North America: Exploitation of a Novel Ecological Niche. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, v. 2009, p. 176532, 2009. ISSN 1687-708X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19266091>>.

DE SCHUTTER, K. et al. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. **Nat Biotechnol**, v. 27, n. 6, p. 561-6, Jun 2009. ISSN 1546-1696. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19465926>>.

DJORDJEVIC, J. T. et al. Secretion of cryptococcal phospholipase B1 (*PLB1*) is regulated by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. **Biochem J**, v. 389, n. Pt 3, p. 803-12, Aug 2005. ISSN 1470-8728. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15826239>>.

ELLERBROEK, P. M. et al. O-acetylation of cryptococcal capsular glucuronoxylomannan is essential for interference with neutrophil migration. **J Immunol**, v. 173, n. 12, p. 7513-20, Dec 2004. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585878>>.

ELLERBROEK, P. M. Effects of the capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte migration and inflammatory mediators. **Curr Med Chem**, v. 11, n. 2, p. 253-66, Jan 2004. ISSN 0929-8673. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14754421>>.

ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi." **Rev Iberoam Micol** 25(2): 101-106, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18473504>>.

FRIEMAN, M. B.; MCCAFFERY, J. M.; CORMACK, B. P. Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesin Epa1p, a beta1,6 glucan-cross-linked cell wall protein. **Mol Microbiol**, v. 46, n. 2, p. 479-92, Oct 2002. ISSN 0950-382X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12406223>>.

GULLO, F. P. et al. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 32, n. 11, p. 1377-91, Nov 2013. ISSN 1435-4373. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141976>>.

HAGEN, F. et al. Ancient dispersal of the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon rainforest. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71148, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23940707>>.

HEITMAN, J.; AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. *Cryptococcus*: from human pathogen to model yeast. Washington, DC: ASM Press, 2011. xvii, 620 p. ISBN 9781555815011.

HERRING, A. C. et al. Induction of interleukin-12 and gamma interferon requires tumor necrosis factor alpha for protective T1-cell-mediated immunity to pulmonary *Cryptococcus*

neoformans infection. **Infect Immun**, v. 70, n. 6, p. 2959-64, Jun 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12010985>>.

HOAG, K. A. et al. IL-12 and IFN-gamma are required for initiating the protective Th1 response to pulmonary cryptococcosis in resistant C.B-17 mice. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 17, n. 6, p. 733-9, Dec 1997. ISSN 1044-1549. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9409560>>.

HUANG, C. et al. Purification and characterization of a second immunoreactive mannoprotein from *Cryptococcus neoformans* that stimulates T-Cell responses. **Infect Immun**, v. 70, n. 10, p. 5485-93, Oct 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12228274>>.

HUFFNAGLE, G. B. et al. The role of CD4+ and CD8+ T cells in the protective inflammatory response to a pulmonary cryptococcal infection. **J Leukoc Biol**, v. 55, n. 1, p. 35-42, Jan 1994. ISSN 0741-5400. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7904293>>.

HUSAIN, S.; WAGENER, M. M.; SINGH, N. *Cryptococcus neoformans* infection in organ transplant recipients: variables influencing clinical characteristics and outcome. **Emerg Infect Dis**, v. 7, n. 3, p. 375-81, 2001 May-Jun 2001. ISSN 1080-6040. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11384512>>.

HUSTON, S. M. et al. *Cryptococcus gattii* is killed by dendritic cells, but evades adaptive immunity by failing to induce dendritic cell maturation. **J Immunol**, v. 191, n. 1, p. 249-61, Jul 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23740956>>.

ISHII, K.; KAWAKAMI, K. Pattern recognition and host defense response to *Cryptococcus neoformans*. **Med Mycol J**, v. 53, n. 4, p. 247-54, 2012. ISSN 1882-0476. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23257725>>.

JANOFF, E. N.; FRANK, D. N. Pathogen-specific antibodies: codependent no longer. **J Clin Invest**, v. 120, n. 4, p. 1039-42, Apr 2010. ISSN 1558-8238. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20335652>>.

JESUS, M. D. et al. Glucuronoxylomannan, galactoxylomannan, and mannoprotein occupy spatially separate and discrete regions in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, v. 1, n. 6, p. 500-8, 2010 Nov-Dec 2010. ISSN 2150-5608. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21178496>>.

JIANG, Z. et al. Treatment of early and established *Cryptococcus neoformans* infection with radiolabeled antibodies in immunocompetent mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 1, p. 552-4, Jan 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22005995>>.

KAWAKAMI, K. et al. T cell-dependent activation of macrophages and enhancement of their phagocytic activity in the lungs of mice inoculated with heat-killed *Cryptococcus neoformans*: involvement of IFN-gamma and its protective effect against cryptococcal infection. **Microbiol Immunol**, v. 39, n. 2, p. 135-43, 1995. ISSN 0385-5600. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7783686>>.

KOGUCHI, Y.; KAWAKAMI, K. Cryptococcal infection and Th1-Th2 cytokine balance. **Int Rev Immunol**, v. 21, n. 4-5, p. 423-38, 2002 Jul-Oct 2002. ISSN 0883-0185. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12486822>>.

KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 193-203, Mar 2011. ISSN 1740-1534. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326274>>.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A**, v. 257, n. 2, p. 213-8, Jul 1984. ISSN 0176-6724. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6207684>>.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; POPKIN, T. J. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. **J Bacteriol**, v. 150, n. 3, p. 1414-21, Jun 1982. ISSN 0021-9193. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6804444>>.

LAM, J. S. et al. A model vaccine exploiting fungal mannosylation to increase antigen immunogenicity. **J Immunol**, v. 175, n. 11, p. 7496-503, Dec 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16301657>>.

LARSEN, R. A. et al. Phase I evaluation of the safety and pharmacokinetics of murine-derived anticryptococcal antibody 18B7 in subjects with treated cryptococcal meningitis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 3, p. 952-8, Mar 2005. ISSN 0066-4804. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15728888>>.

LEVITZ, S. M. et al. Molecular characterization of a mannoprotein with homology to chitin deacetylases that stimulates T cell responses to *Cryptococcus neoformans*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 18, p. 10422-7, Aug 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11504924>>.

LEVITZ, S. M.; SPECHT, C. A. The molecular basis for the immunogenicity of *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 513-24, Jun 2006. ISSN 1567-1356. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16696647>>.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 69-105, 2006. ISSN 0066-4227. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16704346>>.

LOYSE, A. et al. Flucytosine and cryptococcosis: time to urgently address the worldwide accessibility of a 50-year-old antifungal. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 11, p. 2435-44, Nov 2013. ISSN 1460-2091. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23788479>>.

LUPO, P. et al. The presence of capsule in *Cryptococcus neoformans* influences the gene expression profile in dendritic cells during interaction with the fungus. **Infect Immun**, v. 76, n. 4, p. 1581-9, Apr 2008. ISSN 1098-5522. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18250173>>.

MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Adv Appl Microbiol**, v. 67, p. 131-90, 2009. ISSN 0065-2164. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19245939>>.

MANSOUR, M. K.; SCHLESINGER, L. S.; LEVITZ, S. M. Optimal T cell responses to *Cryptococcus neoformans* mannoprotein are dependent on recognition of conjugated carbohydrates by mannose receptors. **J Immunol**, v. 168, n. 6, p. 2872-9, Mar 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884457>>.

MCQUISTON, T. J.; WILLIAMSON, P. R. Paradoxical roles of alveolar macrophages in the host response to *Cryptococcus neoformans*. **J Infect Chemother**, v. 18, n. 1, p. 1-9, Feb 2012. ISSN 1437-7780. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22045161>>.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 4, p. 515-48, Oct 1995. ISSN 0893-8512. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665468>>.

MÜLLER, U. et al. IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. **J Immunol**, v. 179, n. 8, p. 5367-77, Oct 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17911623>>.

OHI, H. et al. Chromosomal DNA patterns and gene stability of *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 14, n. 10, p. 895-903, Jul 1998. ISSN 0749-503X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9717235>>.

OSTERHOLZER, J. J. et al. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. **Am J Pathol**, v. 174, n. 3, p. 932-43, Mar 2009. ISSN 1525-2191. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19218345>>.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525-30, Feb 2009. ISSN 1473-5571. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182676>>.

PERFECT, J. R. The triple threat of cryptococcosis: it's the body site, the strain, and/or the host. **MBio**, v. 3, n. 4, 2012. ISSN 2150-7511. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782526>>.

PIETRELLA, D. et al. Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* promote dendritic cell maturation and activation. **Infect Immun**, v. 73, n. 2, p. 820-7, Feb 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15664921>>.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-21, May 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19547881>>.

ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Passive immunization with melanin-binding monoclonal antibodies prolongs survival of mice with lethal *Cryptococcus neoformans* infection. **Infect Immun**, v. 69, n. 5, p. 3410-2, May 2001. ISSN 0019-9567. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11292764>>.

SAMBROOK, J. & RUSSELL D. W. Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SCHNEIDER, R.; FOGAÇA, N. et al. Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43733, 2012. ISSN 0043-773. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22916306>>.

SHOHAM, S.; LEVITZ, S. M. The immune response to fungal infections. **Br J Haematol**, v. 129, n. 5, p. 569-82, Jun 2005. ISSN 0007-1048. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15916679>>.

SIEGEMUND, S.; ALBER, G. *Cryptococcus neoformans* activates bone marrow-derived conventional dendritic cells rather than plasmacytoid dendritic cells and down-regulates macrophages. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 52, n. 3, p. 417-27, Apr 2008. ISSN 0928-8244. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336384>>.

SPECHT, C. A. et al. Contribution of glycosylation to T cell responses stimulated by recombinant *Cryptococcus neoformans* mannoprotein. **J Infect Dis**, v. 196, n. 5, p. 796-800, Sep 2007. ISSN 0022-1899. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17674324>>.

VARTIVARIAN, S. E. et al. Localization of mannoprotein in *Cryptococcus neoformans*. **J Bacteriol**, v. 171, n. 12, p. 6850-2, Dec 1989. ISSN 0021-9193. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2687257>>.

VILLENA, S. N. et al. Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 6, p. 1274-85, Jun 2008. ISSN 1462-5822. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18284419>>.

VOELZ, K.; MAY, R. C. Cryptococcal interactions with the host immune system. **Eukaryot Cell**, v. 9, n. 6, p. 835-46, Jun 2010. ISSN 1535-9786. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20382758>>.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 2, p. 382-402, Apr 1998. ISSN 0893-8512. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9564569>>.

WORMLEY, F. L. et al. Protection against cryptococcosis by using a murine gamma interferon-producing *Cryptococcus neoformans* strain. **Infect Immun**, v. 75, n. 3, p. 1453-62, Mar 2007. ISSN 0019-9567. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210668>>.

WOZNIAK, K. L. et al. Induction of protective immunity against cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 387-94, Jun 2012. ISSN 1573-0832. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22143898>>.

ZHANG, Y. et al. Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. **Am J Pathol**, v. 175, n. 6, p. 2489-500, Dec 2009. ISSN 1525-2191. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19893050>>.

ZHU, T. et al. A systematical investigation on the genetic stability of multi-copy *Pichia pastoris* strains. **Biotechnol Lett**, v. 31, n. 5, p. 679-84, May 2009. ISSN 1573-6776. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19152072>>.