

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

CARACTERIZAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À REGULAÇÃO DA  
HOMEOSTASIA EM RESPOSTA À PRIVAÇÃO DE NUTRIENTES NA  
LEVEDURA *CRYPTOCOCCUS GATTII*

Camila Diehl

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

Porto Alegre, março de 2022

### CIP - Catalogação na Publicação

Diehl, Camila  
CARACTERIZAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À REGULAÇÃO DA  
HOMEOSTASIA EM RESPOSTA À PRIVAÇÃO DE NUTRIENTES NA  
LEVEDURA CRYPTOCOCCUS GATTII / Camila Diehl. -- 2022.  
81 f.  
Orientador: Charley Christian Staats.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Centro de Biotecnologia do Estado do  
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, BR-RS,  
2022.

1. Cryptococcus. 2. Zinco. 3. Nutrientes. 4.  
Autofagia. I. Staats, Charley Christian, orient. II.  
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Molecular e Celular, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Para seu desenvolvimento, este trabalho contou com fomento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## Agradecimentos

A finalização desse ciclo, que apesar de não ser exatamente como previsto, representa um momento muito importante para mim. Nesses quase 10 anos em que faço parte desse grupo de pesquisa, tive o enorme prazer de conviver com pessoas muito especiais. Agradeço ao Charley por toda a dedicação e ensinamentos, mas principalmente por confiar no meu trabalho e acreditar nesse projeto acima de tudo. Ane, Uriel e Heryk que são mais que colegas de laboratório, mas sim amigos de vida. Nós passamos por muitas situações juntos, agradeço muito por ter vocês sempre do meu lado, especialmente a Ane que durante essa pandemia se tornou uma das pessoas mais próximas de mim e uma das minhas maiores confidentes. Rodrigo, que apesar da pouca convivência propriamente dita, é uma pessoa que gosto muito e admiro. Júlia que sempre esteve presente e disposta a ajudar. Aos guris do 217, Matheus, Nicolau, Felipinho pela convivência e por toda a ajuda. Solon, grande amigo, pela convivência e pelas confissões.

Thiago, Dudu, Bia e Nina por compartilhar comigo as ideias, os ideais e sempre me apoiar na minha busca por ser melhor. À minha mãe, Nara por ser minha principal confidente e acalmar meus medos nesses últimos meses. Ao meu pai, Júlio, que mesmo sem entender exatamente minha vida profissional, sempre me apoiou. À toda a minha família materna, que é a minha base de vida e referência. Todas as mulheres incríveis que me criaram. Agradeço a certos amigos da vida, mesmo sem citar nomes, por me socorrer inúmeras vezes nesse período de pandemia, por cuidar de mim quando adoeci e me colocar para cima quando duvidei de mim mesma.

Aos demais orientadores e colegas pertencentes ao grande grupo de pesquisa, agradeço cada contribuição que fizeram ao meu trabalho.

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES</b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>RESUMO</b> .....  | <b>7</b>  |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>8</b>  |
| <b>1. Introdução</b> .....   | <b>9</b>  |
| 1.1. <i>Cryptococcus gattii</i> e a criptococose .....   | 10        |
| 1.2. Determinantes de virulência .....   | 13        |
| 1.3. Via de infecção e interação patógeno-hospedeiro.....  | 16        |
| 1.4. Imunidade nutricional.....  | 19        |
| 1.5. Estratégias para manutenção da homeostase de células fúngicas.....  | 20        |
| 1.5.1. Homeostase de zinco .....   | 20        |
| 1.5.2. Autofagia.....  | 23        |
| <b>2. Objetivos</b> .....  | <b>28</b> |
| 2.1. Objetivo geral .....  | 28        |
| 2.2. Objetivos específicos .....   | 28        |
| 2.2.1 Capítulo 1: .....  | 28        |
| 2.2.2 Capítulo 2: .....  | 28        |
| <b>3. Resultados</b> .....   | <b>29</b> |
| 3.1. <i>Capítulo 1: Zrg1, a cryptococcal protein associated with regulation of growth in nutrient deprivation conditions</i> ..... | 30        |
| 3.2. <i>Capítulo 2: Connection of a zinc regulated gene and autophagy in Cryptococcus gattii</i> .....                             | 41        |
| <b>4. Discussão geral</b> .....  | <b>55</b> |
| <b>5. Conclusões</b> .....   | <b>63</b> |
| <b>6. Perspectivas</b> .....   | <b>64</b> |
| <b>7. Referências bibliográficas</b> .....   | <b>65</b> |
| <b>CURRICULUM VITAE resumido</b> .....   | <b>75</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês *acquired immunodeficiency syndrome*

CuSO<sub>4</sub> – sulfato de cobre

DNA – ácido desoxirribonucleico

DTPA - do inglês, *Diethylenetriaminepentaacetic acid*

FeCl<sub>3</sub> – cloreto de ferro (III)

GalXM – galactoxilomanana

GO – do inglês, *Gene Ontology*

GXM – glucuronoxilomanana

HIV – do inglês, *human immunodeficiency virus*

IL – interleucina

IPR – do inglês, *intracellular proliferation rate*

MnCl<sub>2</sub> – cloreto de manganês (II)

PAMPS – padrões moleculares associados a patógenos, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*

RNA – ácido ribonucleico

ROS - Espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*

SNC – sistema nervoso central

TPEN - do inglês, *N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine*

ZIP – ZrT, *Irt-like Protein*

ZnCl<sub>2</sub> – cloreto de zinco

ZnT – *Zn transporter*

ZRG1 – *Zinc Related-gene 1*

YNB – do inglês, *yeast nitrogen base*

YPD – do inglês, *yeast-extract peptone dextrose*

## RESUMO

Doenças fúngicas representam um grave problema de saúde mundial. *Cryptococcus gattii* é um dos agentes etiológicos de criptococose, uma infecção fúngica invasiva que se caracteriza por um quadro inicial de infecção pulmonar, podendo afetar o sistema nervoso central. A captação e homeostase de nutrientes é essencial para o desenvolvimento de todos os organismos, por isso os níveis de nutrientes como metais, carbono e nitrogênio é finamente regulada pelas células. Dentre as estratégias utilizadas pelo hospedeiro para se defender contra microrganismos invasores, destaca-se a imunidade nutricional, que consiste no controle da biodisponibilidade de micronutrientes, dentre os quais pode ser citado o zinco. Há diversas evidências relacionando deficiências na regulação dos níveis de zinco com alterações no desenvolvimento e na virulência de *C. gattii*. Para manter a adequada homeostase, *C. gattii* altera seu perfil de expressão gênica, a fim de garantir os níveis necessários de zinco em ambientes diversos. Da mesma forma, as células desta levedura utilizam mecanismos como a autofagia durante períodos em que a disponibilidade de nutrientes, principalmente fontes de nitrogênio, é escassa. Nesse trabalho, nós descrevemos a função de Zrg1. Uma análise do perfil transcricional revelou que a disponibilidade de zinco regula a expressão de *ZRG1* e mutantes nulos demonstraram crescimento prejudicado em condições limitantes de zinco e nitrogênio. Notavelmente, a ausência de Zrg1 levou as células exibirem regulação diferencial de fenótipos relacionados à autofagia. Apesar de não terem sido detectadas diferenças em importantes características associadas à virulência, mutantes nulos para *ZRG1* apresentaram capacidade diminuída de sobrevivência no interior de macrófagos e virulência atenuada em um modelo invertebrado de criptococose. Avaliamos, de forma inicial, a via autofágica nos mutantes nulos para *ZRG1* e descobrimos que essas células apresentam defeitos na autofagia em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio. Juntos, esses resultados indicam que *ZRG1* desempenha um papel importante no metabolismo celular e é necessário para a aptidão e virulência de *C. gattii*.

## ABSTRACT

Fungal diseases are a serious global health problem. *Cryptococcus gattii* is one of the etiologic agents of cryptococcosis, an invasive fungal infection that is characterized by an initial pulmonary infection, which can affect the central nervous system. Nutrient uptake and homeostasis are essential for the growth of all organisms, so the levels of nutrients such as metals, carbon and nitrogen are finely regulated by cells. Among the strategies used by the host to defend itself against invading microorganisms, nutritional immunity stands out, which consists of controlling the bioavailability of micronutrients, such as zinc. There is a lot of evidence linking deficiencies in the regulation of zinc homeostasis with changes in the growth and virulence of *C. gattii*. To maintain adequate homeostasis, *C. gattii* change its gene expression profile to ensure the availability of zinc proper levels in different environments. Likewise, the yeast cells use mechanisms such as autophagy during periods when the availability of nutrients, mainly nitrogen sources, is low. In this work, we describe the function of Zrg1. Transcriptional profile analysis revealed that zinc availability regulates *ZRG1* expression and null mutants showed impaired growth under zinc and nitrogen-limiting conditions. Notably, the absence of Zrg1 led the cells to upregulation of autophagy-like phenotypes. Although no differences were detected in important traits associated with virulence, *ZRG1* null mutants showed decreased ability to survive within macrophages as well as attenuated virulence in an invertebrate model of cryptococcosis. We initially evaluated the autophagic pathway in *ZRG1* null mutants and found that these cells show impaired autophagy under conditions of low nitrogen availability. Together, our results indicate that *ZRG1* plays an important role in cellular metabolism and is necessary for the fitness and virulence of *C. gattii*.



## 1. Introdução

Infecções causadas por fungos possuem uma incidência anual estimada em mais de 1 bilhão de casos em todo o globo. As formas invasivas de infecções fúngicas apresentam alta taxa de mortalidade, sendo prevalentes, principalmente, em indivíduos imunocomprometidos (Vallabhaneni *et al.*, 2016). Os gêneros *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* e *Pneumocystis* são responsáveis pela grande maioria dessas infecções (Bongomin *et al.*, 2017). A criptococose, doença causada pelas leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, possui uma incidência anual de cerca de 278 mil casos, dos quais 223 mil apresentam o quadro mais grave da doença, a meningite criptocócica. A maioria dos casos ocorre em indivíduos HIV positivos, tendo uma taxa de mortalidade anual de aproximadamente 181 mil casos, equivalente a 15% das mortes anuais relacionadas a AIDS (Rajasingham *et al.*, 2017). Apesar de ser responsável por uma pequena taxa dos casos de criptococose, *C. gattii* possui relevância no cenário mundial, pois é capaz de infectar hospedeiros imunocompetentes (Chen, Meyer and Sorrell, 2014).

A infecção por *C. gattii* se inicia pela inalação de células/propágulos fúngicos do ambiente, sendo o pulmão o sítio inicial para o estabelecimento da levedura do no organismo do hospedeiro (Chayakulkeeree and Perfect, 2006). Células do sistema imune inato, como macrófagos alveolares, são a linha de defesa inicial contra o patógeno (Levitz, 1994). Durante a interação patógeno-hospedeiro, os macrófagos são responsáveis por fagocitar as células da levedura e utilizam estratégias como a limitação de nutrientes essenciais, a fim de conter a disseminação da infecção e eliminar o patógeno (Hood and Skaar, 2012). Nesse contexto, *C. gattii* desenvolveu mecanismos para garantir a aquisição de nutrientes nesse ambiente hostil e ser bem-sucedido durante a infecção.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa demonstrou a importância da adequada homeostase de nutrientes no desenvolvimento e virulência de *C. gattii* (Schneider *et al.*, 2012; R. de O. Schneider *et al.*, 2015; Garcia *et al.*, 2020). A caracterização do principal fator de transcrição responsável pela regulação da homeostase de zinco em *C. gattii*, Zap1 (Schneider *et al.*, 2012), abriu um vasto campo de pesquisas envolvendo moléculas que atuam na homeostase desse

metal e, posteriormente, sobre a regulação da homeostase de nutrientes. O presente trabalho foca na caracterização de Zrg1, uma proteína descoberta a partir de investigações para identificação de novos genes reguladores da homeostase de zinco em *C. gattii*. Demonstramos que Zrg1 exerce um papel crucial para o desenvolvimento da levedura em ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes (Diehl *et al.*, 2021), descrevendo mais uma importante molécula que atua na homeostase de nutrientes em *C. gattii*.

### 1.1. *Cryptococcus gattii* e a criptococose

Doenças fúngicas constituem um problema de saúde pública global, atingindo principalmente indivíduos com sistema imune debilitado. Na última década, a incidência de doenças fúngicas invasivas aumentou e está associada com aproximadamente 1,5 milhões de mortes no mundo (Vallabhaneni *et al.*, 2016; *Centers for Disease Control and Prevention, CDC*). Os principais desafios para contenção dessas doenças são os casos de subnotificação, falta de diagnóstico preciso, dificuldade de tratamento e surgimento de linhagens resistentes a antimicrobianos. A criptococose é uma dessas doenças fúngicas prevalentes, responsável por cerca de 220.000 de novos casos por ano, registrando aproximadamente 180.000 mortes (Chayakulkeeree and Perfect, 2006; Rajasingham *et al.*, 2017). O aumento dos casos de HIV e do número de pacientes imunocomprometidos, como indivíduos em tratamentos de terapia intensiva e transplantados, está intimamente relacionado ao aumento dos casos dessa doença (May *et al.*, 2016; Friedman and Schwartz, 2019). Por exemplo, a meningite criptocócica causa mais mortes do que a tuberculose em países onde as taxas de infecção por HIV são altas (Bongomin *et al.*, 2017).

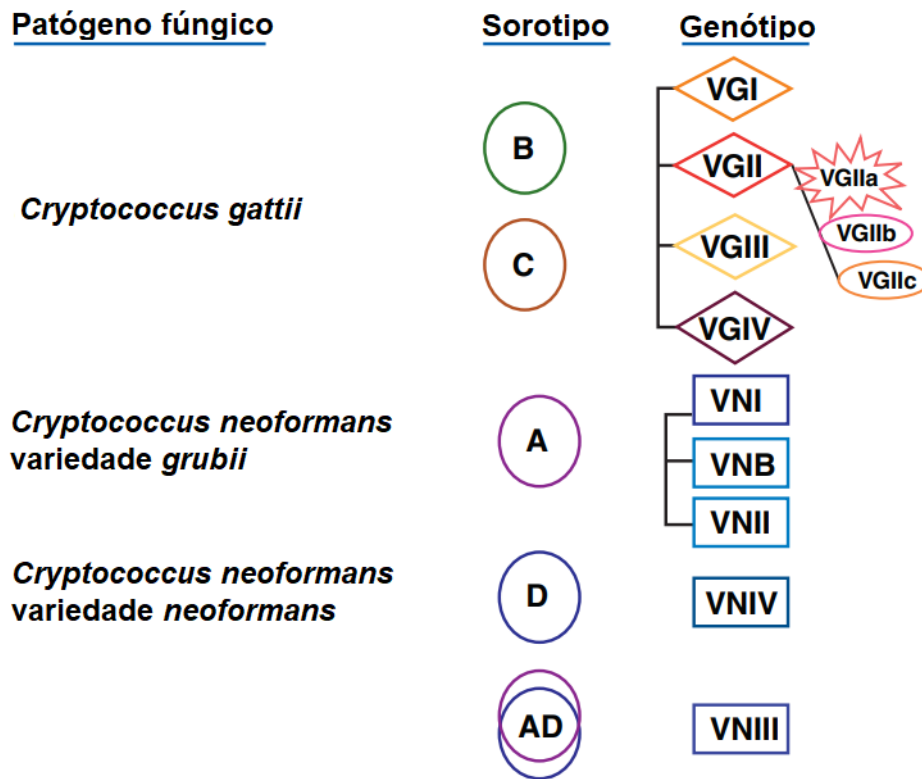
As leveduras encapsuladas *C. neoformans* e *C. gattii* são os principais agentes etiológicos da criptococose, uma infecção fúngica invasiva, caracterizada por um quadro inicial de doença pulmonar que pode evoluir para uma infecção do sistema nervoso central (SNC), conhecida como meningoencefalite, a forma mais grave da criptococose (Springer and Chaturvedi, 2010; Kwon-Chung *et al.*, 2014). Embora essas duas espécies façam parte do mesmo gênero, *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam diferenças importantes quanto a sua infectividade e progressão da doença, além de

compõem nichos distintos na natureza. *C. neoformans* é o principal responsável pelos casos de meningite criptocócica, acometendo majoritariamente indivíduos imunocomprometidos, como um patógeno oportunista. Possui uma distribuição global, sendo encontrado principalmente em excretas de aves (Chayakulkeeree and Perfect, 2006). Entretanto, *C. gattii* tem seu nicho de desenvolvimento na natureza comumente associado com a superfície de plantas e árvores (Lin and Heitman, 2006; Chen, Meyer and Sorrell, 2014). Apesar de ser responsável por uma pequena parcela dos casos de criptococose relatados, *C. gattii* possui grande relevância pois é capaz de infectar hospedeiros imunocompetentes, sendo considerado um patógeno primário (Chen, Meyer and Sorrell, 2014).

Por muitos anos, a criptococose foi considerada como uma doença causada apenas pela espécie *C. neoformans*. Posteriormente, por intermédio de avaliações moleculares, foi sugerida uma subdivisão em *C. neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*, a qual, em 2002, foi categorizada como uma nova espécie, *C. gattii* (Kwon-Chung and Varma, 2006). Estima-se que *C. gattii* divergiu de *C. neoformans* há aproximadamente 37 milhões de anos atrás e posteriormente divergiu nos sorotipos hoje conhecidos como B e C, os quais são classificados a partir de diferenças na composição de sua cápsula polissacarídica. Estudos moleculares permitiram a classificação de 4 tipos moleculares dentro dos sorotipos, que apresentam características fenotípicas distintas. Dentro do sorotipo B, se identificam leveduras com os tipos moleculares VGI e VGII e dentro do sorotipo C, leveduras com os tipos moleculares VGIII e VGIV - Figura 1 (Aminnejad *et al.*, 2012).

O subtipo VGIIa de *C. gattii* apresenta diversas modificações genotípicas, comparada aos outros subtipos da espécie, possivelmente adquiridas por mutações e recombinações cromossômicas, assim como a transferência gênica entre espécies do gênero *Cryptococcus*. Um grande número de genes foi perdido pelas linhagens que compõem esse subtipo, cerca de 146 genes, muitos deles considerados essenciais para o funcionamento de maquinarias celulares (D'Souza *et al.*, 2011). Como exemplo principal, estão os genes *AGO1* e *AGO2* que codificam a proteína argonauta, central na via clássica de RNA de interferência. Por outro lado, a linhagem VGIIa também adquiriu muitos genes

codificantes únicos, que possivelmente contribuíram para a evolução do genoma e aquisição de novos mecanismos de evasão da resposta imune e sobrevivência da célula fúngica (Ferrareze *et al.*, 2021).



**Figura 1: Sorotipos e tipos moleculares de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*.** As linhagens de *C. gattii* são sorotipo B ou C. As linhagens do sorotipo BC foram raramente relatadas. *C. neoformans* var. *grubii* são sorotipo A, enquanto *C. neoformans* var. *neoformans* são sorotipo D. Os tipos moleculares de *C. gattii* e *C. neoformans* são baseados na análise molecular de sequência multilocus de vários fragmentos de genes. Adaptado de (Chaturvedi and Chaturvedi, 2011a).

O subtipo VGIIa é considerado o mais virulento e com a mais baixa susceptibilidade a drogas antifúngicas. Linhagens do tipo VGIIa foram responsáveis pelo surto que ocorreu em Vancouver no Canadá e noroeste dos Estados Unidos entre 1999 – 2007, trazendo foco aos casos de criptococose causados por *C. gattii*. Enquanto outras linhagens são relacionadas a climas quentes, esse subtipo apresenta uma mudança de habitat para climas

temperados, podendo ser também considerado um patógeno de distribuição global (Chaturvedi and Chaturvedi, 2011b; Harris *et al.*, 2011).

Foi proposto, recentemente, que *C. neoformans* e *C. gattii* compreendem, na verdade, um complexo de espécies, e que fosse então feita uma separação por novos nomes (Kwon-Chung *et al.*, 2017). Estudos genotípicos identificaram sete espécies pertencentes ao grupo *C. gattii* / *C. neoformans* (Hagen *et al.*, 2015). Como a nova nomenclatura ainda é discutida e não amplamente aceita, usaremos a nomenclatura clássica ao longo do texto. O modelo de estudo desse trabalho foi *C. gattii* linhagem R265, que pertence ao subtipo VG11a, sendo considerada uma linhagem hipervirulenta.

## 1.2. Determinantes de virulência

Fungos patogênicos apresentam uma série de estratégias para garantir o sucesso da infecção de seus hospedeiros. A virulência de espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* está associada a características morfológicas e fisiológicas que auxiliam a replicação e sobrevivência do patógeno durante o contexto de infecção. Essas características, conhecidas como determinantes de virulência, são bem caracterizadas em *C. neoformans*. Porém, *C. gattii* apresenta o mesmo conjunto de determinantes de virulência que *C. neoformans*. Entre os determinantes principais estão: a produção da cápsula polissacarídica, produção e acúmulo do pigmento melanina, capacidade de desenvolvimento a 37 °C e expressão de proteínas que auxiliam a sobrevivência e replicação no interior do hospedeiro (Kwon-Chung *et al.*, 2014; Zaragoza, 2019).

A cápsula polissacarídica é uma estrutura altamente hidratada, que varia de tamanho dependo de diversos estímulos aos quais as células de *Cryptococcus* sp. são submetidas. Sabe-se que a produção da cápsula é positivamente induzida em meios estressores que mimetizam as condições de interação com o hospedeiro no contexto da infecção (Garcia-Hermoso, Dromer and Janbon, 2004; Ma and May, 2009). A cápsula é composta majoritariamente por glucuronoxilomanana (GXM), responsável por cerca de 95% da massa capsular e, em menor proporção, por galactoxilomanana (GalXM) e manoproteínas (Zaragoza *et al.*, 2009). Os componentes são sintetizados

internamente e exportados para o meio extracelular principalmente por meio de vias de tráfego de vesículas, para que a montagem e agregação dos componentes ocorra (Rodrigues *et al.*, 2007). A cápsula possui diversas funções na virulência de *Cryptococcus sp.*, como, por exemplo, pelo aumento o tamanho celular total do patógeno, dificultando a internalização por fagócitos (Ma and May, 2009; Rocha *et al.*, 2015). Outra função importante é mascarar os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS), protegendo a célula fúngica do reconhecimento exercido pela imunidade inata do hospedeiro (Montes *et al.*, 2016).

A capacidade de se desenvolver a 37 °C é outra característica determinante para a patogenicidade de *C. gattii*. De fato, esse pode ser considerado o maior diferencial entre espécies patogênicas e não patogênicas de *Cryptococcus*, já que esta capacidade é crucial durante a infecção de hospedeiros mamíferos e de outros organismos homeotérmicos (Kwon-Chung *et al.*, 2014). A regulação desta característica se dá majoritariamente pela via regulada por calcineurina, composta pelas unidades Cna1 e Cnb1. Cna1 possui um papel essencial para a termotolerância e virulência de *C. gattii*, sendo sua função conservada também em *C. neoformans*. Normalmente, linhagens que não possuem esse gene são consideradas avirulentas em ambas as espécies, devido a incapacidade de desenvolvimento a temperatura do hospedeiro e de se desenvolver em outras formas de estresse. Apesar do papel conservado de Cna1 na termotolerância, linhagens de *C. gattii* VGIIa que não apresentam calcineurina funcional são viáveis em altas temperaturas, embora apresentem uma severa atenuação da virulência (Chen *et al.*, 2013). No entanto, já foi demonstrado que outros genes, como *TPS1* e *TPS2*, tem influência na termotolerância de *C. gattii*. *TPS1* e *TPS2* codificam uma trealose-6-fosfato sintase, que atua na síntese de um antioxidante responsável pela proteção das células contra estresses ambientais (Ngamskulrungrroj *et al.*, 2009).

Melanina é um pigmento hidrofóbico produzido por uma grande variedade de fungos. Encontra-se normalmente depositado na parede celular, desempenhando importante papel na proteção contra diversos tipos de estresse. A melanina é sintetizada a partir de compostos fenólicos, como L-DOPA, produzindo um pigmento que se deposita na parede celular de *C. gattii* e de

outras espécies do gênero pela interação de cátions divalentes (Camacho *et al.*, 2019). Tais substratos são metabolizados pela enzima lacase (Waterman *et al.*, 2007). Já foi descrito que a melanina é capaz de estabilizar radicais livres, atuando como antioxidante contra espécies reativas de oxigênio (ROS) gerados pelo hospedeiro e também parece ser importante na proteção contra fagocitose, morte por leucócitos do hospedeiro, defesa contra peptídeos antimicrobianos e agentes antifúngicos (Wang and Casadevall, 1994; Kwon-Chung *et al.*, 2014). É interessante destacar que a distribuição do pigmento durante a deposição na parede celular é diferente entre *C. gattii* e *C. neoformans*. Enquanto que em *C. neoformans* a melanina se encontra depositada de maneira heterogênea, formando múltiplas camadas de densidade eletrônica variável, em *C. gattii* a distribuição do pigmento ocorre de maneira uniforme, formando uma única camada elétron densa na parede celular do fungo. Essas diferenças ocorrem devido a constituição de quitosana presente na parede celular das espécies. Apesar disso, ambas espécies apresentam atenuação de virulência pela perda da capacidade de síntese e/ou deposição de melanina (Press *et al.*, 2020).

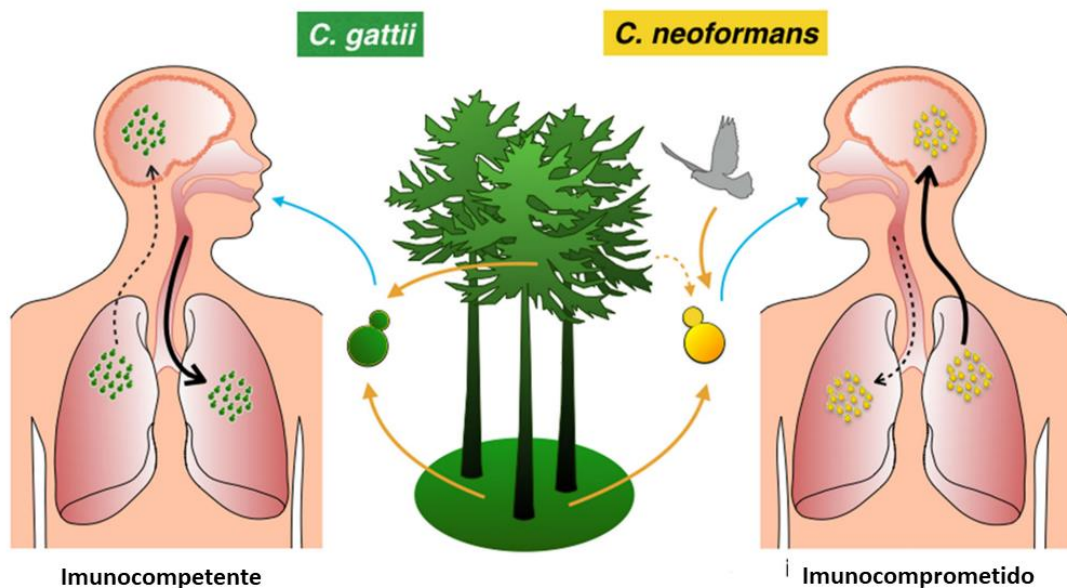
Vesículas extracelulares de *Cryptococcus* participam no processo de exportação de fatores de virulência durante a interação patógeno-hospedeiro. Dentre os conteúdos presentes nessas vesículas está o GXM, além de proteínas importantes na virulência, como a lacase e a urease (Rodrigues *et al.*, 2007). As vesículas atuam como veículo de comunicação entre as células patogênicas a longa distância, sendo responsáveis por mediar o processo de “divisão de trabalho” (Bielska *et al.*, 2018). Após a fagocitose, células de *C. gattii* ativam um modelo de “divisão de trabalho”, onde algumas células adotam uma modificação da morfologia mitocondrial, passando a apresentar mitocôndrias em forma tubular. Conseqüentemente, ao adotarem essa modificação, essas células deixam de se dividir, possibilitando a rápida proliferação das células vizinhas ao neutralizar ROS produzidas pelos fagócitos, contribuindo para o aumento da população como um todo (Voelz *et al.*, 2014). Juntos, todos esses mecanismos permitem altas taxas de replicação intrafagossômica, que contribuem para o estabelecimento e sucesso da infecção por *C. gattii*.

### 1.3. Via de infecção e interação patógeno-hospedeiro

As infecções por espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* tem início por via respiratória, por meio da inalação de propágulos fúngicos presentes no ambiente - Figura 2 (Chayakulkeeree and Perfect, 2006). Os propágulos infecciosos, os quais podem ser basidiósporos ou leveduras dessecadas, apresentam um tamanho reduzido (aproximadamente 3 µm) e, dessa forma, tem facilidade em atravessar as barreiras físicas impostas pelo organismo do hospedeiro e conseguem alojar-se nos alvéolos pulmonares (Velagapudi *et al.*, 2009). Nesse ambiente, as células fúngicas são desafiadas inicialmente pelo sistema imune inato do hospedeiro, que apresenta células fagocíticas, como macrófagos alveolares, células dendríticas e neutrófilos, para combater o patógeno. Macrófagos alveolares desempenham um papel central na contenção da infecção, tanto pela fagocitose dessas leveduras, quanto pela produção de citocinas pró-inflamatórias que participam na modulação e recrutamento de células imunes para o ambiente infeccioso (Erwig and Gow, 2016; Montes *et al.*, 2016; Garelnabi and May, 2018).

O patógeno pode ser fagocitado e destruído, assim como pode sobreviver e utilizar esse nicho para se replicar, posteriormente podendo se dispersar pelo organismo do hospedeiro (Bain *et al.*, 2012; Gilbert, Wheeler and May, 2015). Diversos estudos mostram que as infecções por *C. gattii* estão mais restritas ao ambiente pulmonar, levando os pacientes a apresentarem quadros mais relacionados a doenças respiratórias e/ou criptococomas pulmonares (Harris *et al.*, 2011; Akins and Jian, 2019), diferente de *C. neoformans* que apresenta um tropismo maior pelo sistema nervoso central. Porém, *C. gattii* também é capaz de afetar o SNC, assim como outros órgãos como pele, ossos, fígado, baço e nódulos linfáticos (Ngamskulrungraj *et al.*, 2012). Após o estabelecimento de uma infecção pulmonar primária, as leveduras podem permanecer latentes no interior de macrófagos e serem reativadas posteriormente, ou se disseminar pelo organismo do hospedeiro através da corrente sanguínea, utilizando os próprios macrófagos como veículo (Sabiiti and May, 2012).





**Figura 2: Ilustração esquemática de um processo de infecção de *C. gattii* e *C. neoformans*.** Uma infecção começa com a inalação de propágulos infecciosos transportados pelo ar, o que pode permitir que o patógeno se instale nos pulmões. Em casos em que o fungo atinge o sistema nervoso central, isso pode levar a uma infecção cerebral, que pode ser letal. Adaptado de (Bielska and May, 2015).

Sabe-se que os perfis de resposta imune Th1 e Th17 são protetores contra *Cryptococcus*. A produção de citocinas pró-inflamatórias características desses perfis estão relacionadas com a diminuição da carga fúngica pulmonar e um melhor prognóstico da doença. A modulação desses perfis de resposta é uma das estratégias utilizadas por *C. gattii* para evadir o contexto imunológico e ser bem sucedido na infecção (Montes *et al.*, 2016). Como comentado anteriormente, macrófagos alveolares são a principal linha de defesa inicial nesse contexto. Os macrófagos podem, dependendo de moléculas sinalizadoras presentes no microambiente onde se encontram, ser ativados em um perfil clássico (M1), ou em um perfil alternativo (M2) (Murray *et al.*, 2014). Macrófagos M1 são ativados por citocinas pró-inflamatórias, como as do perfil Th1, e são associados a eliminação de patógenos, produção de ROS, e manutenção da produção de citocinas pró-inflamatórias no ambiente da infecção (Atri, Guerfali and Laouini, 2018). A ativação alternativa, induzida por perfil de citocinas Th2, contribui para regulação da resposta inflamatória, fagocitose e limpeza de restos celulares e possui papel chave no processo de cicatrização, porém não é protetora contra patógenos (Gordon, 2003; Murray *et al.*, 2014).

A depleção de macrófagos em diferentes modelos animais de criptococose está relacionada com uma maior carga fúngica em tecidos infectados, evidenciando que a presença dessas células é pivotal como primeira linha de defesa do hospedeiro (Levitz, 1994). A diferenciação de macrófagos para o perfil M1 também é associada com melhores prognósticos da doença tanto em modelos animais quanto em humanos. Contudo, o equilíbrio da ativação dos perfis M1/M2 durante a resposta imune é o que garante a contenção da infecção e eliminação do patógeno (Hardison *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 2013). *C. gattii* induz maior produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6) em células humanas mononucleares de sangue periférico de humanos, além das citocinas de células T como interleucina 17 (IL-17) e interleucina 22 (IL-22) comparado a *C. neoformans*, *in vitro*. Porém, esse patógeno é relacionado ao desvio da resposta imune para perfis não característicos de Th1/Th17 *in vivo*, levando a produção de citocinas do tipo Th2 (Schoffelen *et al.*, 2013; Angkasekwinai *et al.*, 2014). Macrófagos também parecem estar associados com a formação e manutenção de criptocomas, estruturas características da infecção de *C. gattii*, que se supõe servirem como uma barreira física para impedir a replicação e disseminação da infecção (Qureshi *et al.*, 2010).

No contexto de infecção por espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*, as células da levedura são fagocitadas e contidas em uma estrutura denominada fagossomo. O fagossomo apresenta um ciclo de maturação através da fusão com diversas vesículas endocíticas e lisossomos, formando uma estrutura de pH ácido, alta concentração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, baixa disponibilidade de nutrientes e presença de enzimas líticas e peptídeos antimicrobianos. Esta estrutura é denominada fagolisossomo (Johnston and May, 2013; Gibson and Johnston, 2015). Trata-se de uma estrutura especializada para responder a patógenos, demonstrando a importância da imunidade inata durante a interação patógeno-hospedeiro (Westman *et al.*, 2020). Porém, após a fagocitose das células fúngicas pelos fagócitos, alguns desfechos são possíveis: (I) eliminação dos patógenos no fagolisossomo; (II) as células do patógeno podem permanecer latentes no interior dos macrófagos; (III) replicação das leveduras no interior do macrófago e posterior extrusão,

causando a lise do mesmo; (IV) transferência das células da levedura para outro macrófago sem causar lise; (V) escape do interior do macrófago sem causar a lise (vomocitose) (Alvarez and Casadevall, 2006; Johnston and May, 2013).

Por ser uma levedura de origem ambiental, acredita-se que muitas dessas estratégias surgiram após coevolução com predadores ambientais, como, por exemplo, amebas de vida livre (Steenbergen, Shuman and Casadevall, 2001). Amebas são capazes de fagocitar bactérias e fungos no ambiente e utilizam estratégias semelhantes aos macrófagos para eliminação destes. Essa teoria é suportada por estudos comparando o perfil transcricional de leveduras fagocitadas por amebas e por macrófagos murinos (Casadevall *et al.*, 2019; Fu *et al.*, 2021).

#### 1.4. Imunidade nutricional

Como apresentado até aqui, macrófagos apresentam diversos mecanismos para eliminação de patógenos. Uma dessas estratégias é a chamada imunidade nutricional (Doherty, 2007; Hood and Skaar, 2012). Nesta, fagócitos e células epiteliais restringem a disponibilidade de nutrientes essenciais no contexto da infecção, gerando um ambiente hostil para o desenvolvimento de organismos. Dentre os nutrientes restringidos durante esse processo, destacam-se fontes de carbono e nitrogênio e micronutrientes metálicos, como ferro, zinco, manganês e cobre (Crawford and Wilson, 2015; Sheldon and Skaar, 2019).

Durante a interação com patógenos fúngicos intracelulares, as células fagocíticas utilizam estratégias diferentes das vias clássicas de depleção de zinco. *C. neoformans*, *C. gattii*, *Candida glabrata* e *Histoplasma capsulatum* parecem experienciar um estágio intrafagossômico prolongado dentro de macrófagos, particularmente. Esse período representa uma característica importante durante os ciclos de infecção dessas leveduras, permitindo a evasão de outros mecanismos de imunidade do hospedeiro (Seider *et al.*, 2010). Durante a infecção por *H. capsulatum*, macrófagos utilizam a estratégia de mobilização de zinco para o aparelho de Golgi, por meio da ação dos transportadores de zinco ZnT4 e ZnT7. A expressão desses transportadores é positivamente

regulada em resposta a infecção pela levedura. Essa classe de proteínas transportadoras de efluxo de cátions atua no transporte de zinco do citosol para organelas ou para fora da célula, tornando os fagolisossomos dos macrófagos contendo fungos um ambiente de baixa disponibilidade de zinco. Dentro do macrófago, a disponibilidade de zinco foi ainda mais restrita pela ação das metalotioneínas de ligação ao zinco (McCormick and Kelleher, 2012; SubramanianVignesh *et al.*, 2013; Vignesh *et al.*, 2013). O aumento da carga total de zinco nesses macrófagos pode ser necessário para lidar com o aumento da demanda metabólica associada à eliminação de leveduras fagocitadas. Alternativamente, o aumento da absorção de zinco pelos macrófagos pode fazer parte de uma estratégia imunológica para esgotar o zinco do ambiente extracelular (SubramanianVignesh *et al.*, 2013).

Frente a isso, patógenos fúngicos desenvolveram mecanismos de aquisição desses nutrientes, a fim de garantir sua sobrevivência. Esses mecanismos geram uma constante disputa por nutrientes durante a interação patógeno-hospedeiro. Com foco nos resultados que serão apresentados nesse trabalho, a seguir serão revisadas as estratégias utilizadas por *C. gattii* para manutenção da homeostase de zinco e manutenção da homeostase celular por meio da autofagia.

## **1.5. Estratégias para manutenção da homeostase de células fúngicas**

### **1.5.1. Homeostase de zinco**

Zinco é um micronutriente essencial para o desenvolvimento da vida, pois participa de uma série de funções catalíticas de diversas enzimas (Lulloff, Hahn and Sohnle, 2004). Estima-se que cerca de 5% do proteoma predito de *Saccharomyces cerevisiae* corresponda a proteínas de ligação de zinco, evidenciando a abundância do domínio de dedos de zinco no genoma de células fúngicas (Staats *et al.*, 2013). A maioria das proteínas de ligação de zinco foram inicialmente identificadas como ligantes de DNA/RNA, exercendo papéis na regulação da transcrição e/ou tradução na célula (Laity, Lee and Wright, 2001). Porém, proteínas de ligação a zinco não estão restritas apenas a ligação com

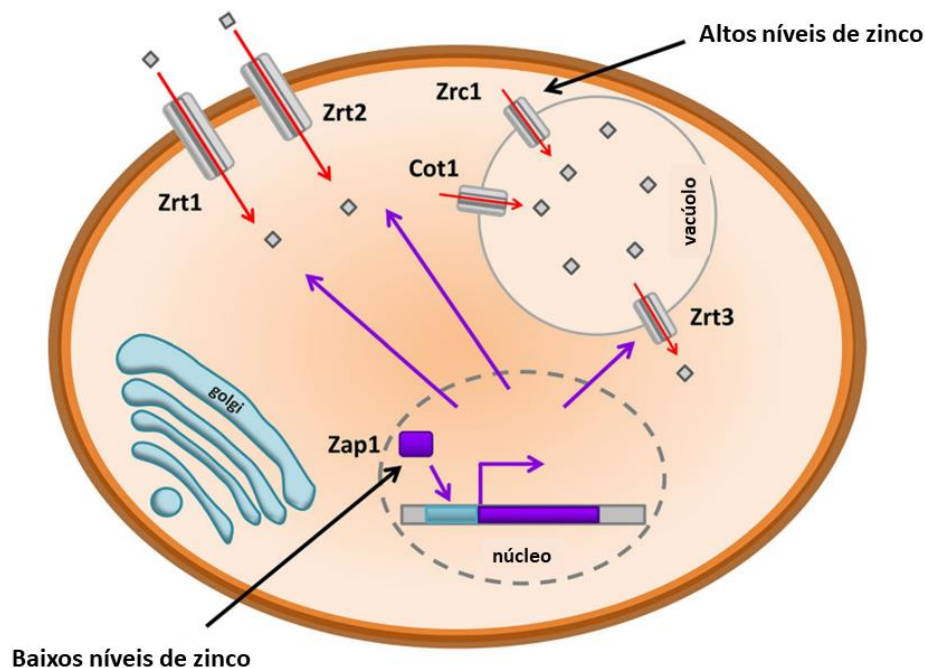
ácidos nucleicos, mas também exercem uma série de outras funções fisiológicas, como regulação da homeostase de zinco, remodelamento de cromatina, interações proteína-proteína e interações com lipídeos (Laity, Lee and Wright, 2001; MacPherson, Larochele and Turcotte, 2006). O genoma de *Cryptococcus* contém muitos genes anotados como codificadores de proteínas de ligação de zinco. Mais de 120 genes contendo motivos dedo de zinco foram identificados e caracterizados em *C. neoformans* (Li and Liu, 2020). A anotação funcional, revelou que esses genes estão envolvidos em diversas vias de sinalização de processos fisiológicos essenciais na célula, como a regulação da reprodução sexuada para produção de basidiósporos e da morfogênese de hifas, regulação das respostas celulares de resistência ao estresse e produção de determinantes de virulência (Li and Liu, 2020). Portanto, os níveis de zinco disponíveis para a célula precisam ser finamente regulados.

Em fungos, genes envolvidos no transporte e homeostase de zinco são regulados a nível transcricional em resposta a variação da disponibilidade do metal (Wilson and Amanda J. Bird, 2016). Os mecanismos associados ao metabolismo de zinco são bem caracterizados em *S. cerevisiae*. Zap1 é o principal fator de transcrição envolvido na resposta adaptativa a disponibilidade de zinco no ambiente, controlando a expressão de muitos genes. Zap1 age principalmente como um ativador transcricional responsivo a zinco, tendo sua expressão aumentada quando os níveis de zinco são baixos (Bird *et al.*, 2006). Em *S. cerevisiae*, este fator de transcrição regula a expressão de aproximadamente 80 genes em resposta a disponibilidade de zinco, entre eles, os transportadores de zinco da família ZIP (Lyons *et al.*, 2000). *S. cerevisiae* possui três transportadores pertencentes a essa família, caracterizados até o momento, envolvidos na homeostase de zinco; o transportador de alta afinidade Zrt1 e os transportadores de baixa afinidade Zrt2 e Zrt3 (Zhao and Eide, 1996a; MacDiarmid, Gaither and Eide, 2000; Eide, 2003). A inativação do gene *ZRT1* levou as células de *S. cerevisiae* a apresentarem menor capacidade de desenvolvimento em condições de privação de zinco. Na ausência de Zrt2 o mesmo fenótipo não foi observado, porém essas células apresentaram menores níveis de zinco intracelular. (Zhao and Eide, 1996a, 1996b). Zrt3 atua no efluxo de zinco do vacúolo para o citosol e tem sua expressão regulada positivamente

durante condições de baixa disponibilidade de zinco, como Zrt1 e Zrt2 (Simm *et al.*, 2007). Outros transportadores não específicos também podem participar de forma importante na regulação da homeostase de zinco. É o caso das proteínas de membrana vacuolares Zcr1 e Cot1, que atuam no transporte tanto de zinco, quanto de ferro e cobalto, respectivamente - Figura 3 (Miyabe, Izawa and Inoue, 2001; Crawford and Wilson, 2015)

Uma grande diversidade de mecanismos para manutenção da homeostase de zinco ocorre em fungos patogênicos. Porém, a regulação transcricional envolvida nesse processo é altamente conservada entre as espécies fúngicas. Zap1 é um regulador transcricional caracterizado em três diferentes espécies de fungos patogênicos: *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* e *C. gattii* (Moreno *et al.*, 2007; Nobile *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2012). É interessante notar que a deleção dos homólogos de *ZAP1* causa atenuação da virulência nas três espécies, evidenciando a necessidade da regulação associada a esse fator de transcrição na homeostase de zinco para o estabelecimento de infecções.

Em *C. gattii*, a maior resposta à ativação de Zap1 pela privação de zinco se dá pelo aumento da expressão de transportadores envolvidos na captação de zinco, como os transportadores da família *ZIP* (Schneider *et al.*, 2012; Jung, 2015). Zip1, Zip2 e Zip3 são proteínas caracterizadas funcionalmente em *C. gattii*, sendo todas envolvidas com a captação e armazenamento de metais na levedura (R. D. O. Schneider *et al.*, 2015; Garcia *et al.*, 2020). Zip1 é o principal transportador de zinco em *Cryptococcus*, sendo filogeneticamente relacionado ao transportador Zrt1 de *S. cerevisiae*. Os níveis relativos de transcritos de *ZIP1* são diretamente regulados por Zap1 em resposta a disponibilidade de zinco. *ZIP2* codifica uma proteína homóloga a Zrt2 de *S. cerevisiae*, que possui uma função secundária no transporte de zinco em *Cryptococcus* (Schneider *et al.*, 2015; Do *et al.*, 2016). Em um trabalho recente, o nosso grupo demonstrou que a ausência de expressão de *ZIP1* leva as células de *C. gattii* a apresentarem severos defeitos na capacidade de desenvolvimento em condições de escassez de zinco. Mutantes nulos para *ZIP1* e a linhagem duplo mutante para *zip1/zip2* apresentaram virulência atenuada (Schneider *et al.*, 2015).



**Figura 3: Metabolismo de zinco em *S. cerevisiae*.** Transportadores de alta (Zrt1) e baixa (Zrt2) afinidade realizam o transporte do metal para o citoplasma celular, enquanto que Zrt3, Zrc1 e Cot1 atuam nos vacúolos celulares. A regulação da expressão dos genes codificadores para os transportadores de zinco da família ZIP é realizada pelo fator de transcrição Zap1, o qual também tem sua expressão regulada pela disponibilidade de zinco. Adaptada de (Crawford and Wilson, 2015).

### 1.5.2. Autofagia

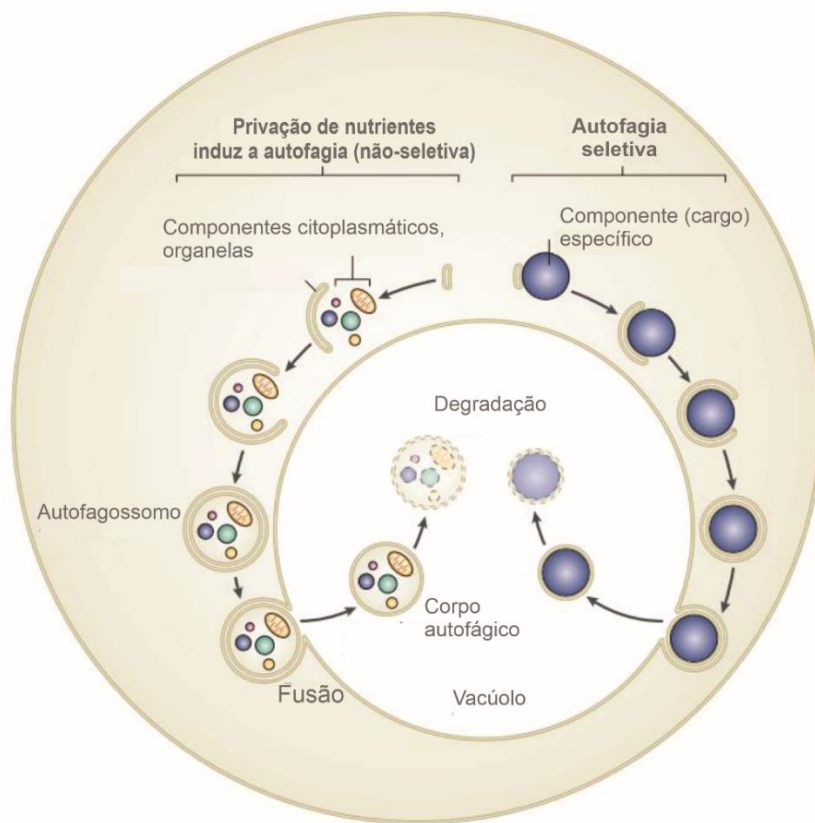
Em condições ambientais e durante o processo de interação com o hospedeiro, patógenos fúngicos encontram condições onde a disponibilidade de nutrientes é limitada e utilizam uma série de mudanças metabólicas para sobreviver a esses períodos (Eide, 2009; Ries *et al.*, 2018). Até agora, discutimos sobre os mecanismos de manutenção da homeostase celular a partir da regulação da expressão de transportadores responsáveis pela captação de zinco. Mas, células eucarióticas apresentam outras estratégias para garantir a adequada homeostase de zinco e de outros nutrientes essenciais em condições adversas. Um importante mecanismo é a autofagia.

A autofagia é um processo de reciclagem celular, onde componentes citoplasmáticos, incluindo proteínas, RNA ribossômico e fosfolípidios de

membranas, são degradados (Yang and Klionsky, 2010; Ohsumi, 2014). Na autofagia, uma porção do citoplasma é sequestrada em uma estrutura de membrana dupla, o autofagossomo, que se funde com os lisossomos/vacúolo, encaminhando essa estrutura para degradação (Kraft, Reggiori and Peter, 2009; Kraft and Martens, 2012). É um processo extremamente conservado em eucariotos, que apresenta uma via de regulação bastante complexa. A formação, expansão, fusão com o vacúolo e degradação do autofagossomo são as principais etapas dessa via em leveduras, reguladas por uma série de genes relacionados à autofagia (genes *ATG*) (Suzuki *et al.*, 2007; Nakatogawa *et al.*, 2009).

A privação de nitrogênio é o estímulo que leva à resposta autofágica mais rápida e ampla em leveduras, mas ambientes com baixa disponibilidade de fontes de carbono, ácidos nucléicos e zinco já foram descritos como capazes de induzir a autofagia em menor grau (Tsuboi, 1992; Kawamata *et al.*, 2017). A depleção de nutrientes desencadeia a autofagia (macroautofagia ou autofagia não-seletiva), que desempenha um papel essencial na adaptação desses microrganismos em condições de privação de fontes de carbono, nitrogênio ou de outros micronutrientes (Onodera and Ohsumi, 2005b; Huang *et al.*, 2015). Porém, em condições normais de desenvolvimento, onde existe a disponibilidade de nutrientes, ela cumpre o papel do transporte seletivo de precursores de hidrolases vacuolares do citosol para o vacúolo, em um processo chamado de via de direcionamento do citosol para o vacúolo (Cvt) - Figura 4 (Harding *et al.*, 1996; Yamasaki and Noda, 2017). Quando a autofagia é induzida, a especificidade do conteúdo (carga) no interior dessas vesículas é perdida e mais membranas precisam ser mobilizadas para sustentar esse processo. Certos componentes da maquinaria de proteínas Atg, que já estão ativos durante as condições de desenvolvimento vegetativo, se ajustam parcial ou completamente para desempenhar funções na via autofágica quando os nutrientes são limitados. A maioria dos componentes necessários para a formação de vesículas de membrana dupla são compartilhados pela via Cvt e autofagia. Algumas proteínas Atg, no entanto, são especificamente necessárias para qualquer uma dessas vias, o que pode explicar em parte as diferenças entre esses processos (Harding *et al.*, 1995; Cebollero and Reggiori, 2009).





**Figura 4: Autofagia em *S. cerevisiae*.** Na autofagia induzida pela privação (não seletiva) de nutrientes, a membrana de isolamento envolve principalmente os constituintes citoplasmáticos de forma não seletiva e organelas para formar o autofagossomo. A estrutura interna ligada à membrana do autofagossomo (o corpo autofágico) é liberada no lúmen vacuolar após a fusão da membrana externa com a membrana vacuolar e é desintegrada para permitir a degradação do conteúdo por hidrolases residentes. Na autofagia seletiva, cargas específicas (complexos proteicos ou organelas) são envolvidas por vesículas de membrana que são semelhantes aos autofagossomos e são entregues ao vacúolo para degradação. Embora a via Cvt (via de direcionamento do citosol para o vacúolo) seja responsável pelo transporte de enzimas vacuolares, sua dinâmica de membrana e mecanismo são quase os mesmos da autofagia seletiva. Adaptado de (Nakatogawa et al., 2009).

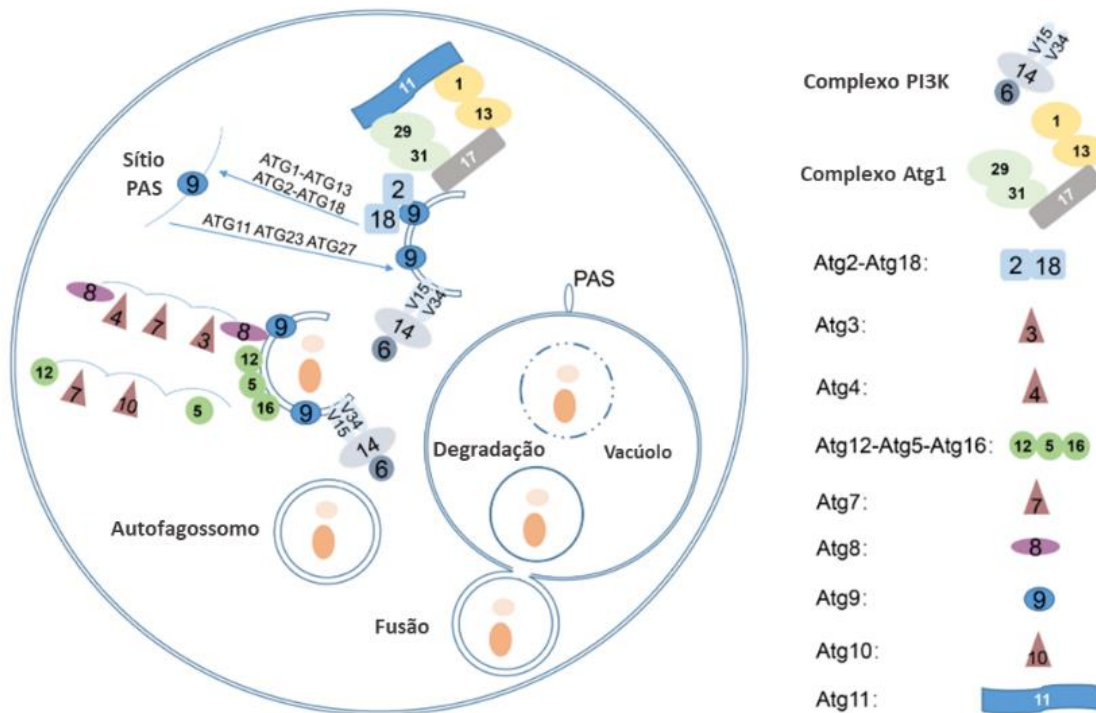
Em *S. cerevisiae*, mais de 40 genes *ATG* já foram identificados e a maioria das proteínas codificadas por esses genes desempenham papéis importantes na regulação da via autofágica na célula fúngica (Cebollero and Reggiori, 2009). De uma maneira geral, as funções desempenhadas pelas proteínas Atg de células fúngicas são semelhantes as descritas para proteínas Atg de células mamíferas (Meijer *et al.*, 2006). *ATG1* é o primeiro gene *ATG* identificado em leveduras e codifica uma Ser/Thr quinase (Matsuura *et al.*, 1997). Atg1 forma um

complexo com Atg13, que desempenha um papel vital para o início da ativação da via autofágica. Atg13 é altamente fosforilada pela quinase Torc1 em condições de disponibilidade de nutrientes, no entanto, é rapidamente desfosforilada quando as condições de disponibilidade de nutrientes mudam, servindo como um sinalizador da estrutura pré-autofagossômica (PAS) - Figura 5 (Kawamata *et al.*, 2008). Dentro da hierarquia complexa de proteínas reguladoras da via autofágica, algumas proteínas Atg desempenham papéis indispensáveis, como Atg4 e Atg7 que possuem funções catalíticas no processamento de outras proteínas Atg. Atg8 tem um papel central na via, formando uma conjugação com fosfatidiletanolamina (PE) que regula a etapa de expansão do autofagossomo pelo isolamento de membranas. O complexo Atg8-PE permanece associado a membrana do autofagossomo durante todo o processo de maturação. Atg4 também é a enzima responsável pela desconjugação de Atg8 após a fusão com o vacúolo (Kihara *et al.*, 2001; Kawamata *et al.*, 2008; Nakatogawa *et al.*, 2009). No entanto, muitos *ATG* codificam proteínas com funções redundantes para regulação da via (Zhao *et al.*, 2019a).

O complexo formado por PI3K tem um papel pivotal na regulação da etapa de formação do autofagossomo e participa da sinalização de resposta a disponibilidade de nitrogênio. O complexo PI3K envolve, além de proteínas Atg, uma série de proteínas acessórias, como Vps34 e Vps15, necessárias para a ativação das etapas seguintes da via autofágica em leveduras - Figura 5 (Kihara *et al.*, 2001). Em *C. neoformans*, a inativação do gene *VPS34* leva as células a apresentar severos defeitos na autofagia, pela perda da capacidade da célula em formar vesículas autofágicas. Adicionalmente, estes mutantes tem sua virulência atenuada em modelos murinos de infecção (Hu *et al.*, 2008).

Alguns estudos mostram o papel essencial de genes *ATG* para o desenvolvimento e virulência de *C. neoformans*. A deleção de *ATG7* ou *ATG8* levou as células da levedura a apresentarem hipersensibilidade ao desenvolvimento em condições de privação de nutrientes e, em ambos os casos, a virulência foi atenuada (Oliveira *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2018). Até o momento, 22 genes *ATG* foram caracterizados em *C. neoformans*, mostrando que a deleção de determinados genes *ATG* influencia na capacidade de resposta ao

estresse e altera a expressão de determinantes de virulência na célula (Zhao *et al.*, 2019a).



**Figura 5: Visão geral da via da maquinaria de proteínas Atg em levedura.** Os cinco estágios principais da autofagia: (1) formação de vesículas no sítio PAS pela nucleação do fagóforo na levedura; (2) o fagóforo se expande para sequestrar a carga; (3) o fagóforo fecha os autofagossomos de membrana dupla; (4) o autofagossomo se funde com o vacúolo, liberando a vesícula interna, conhecida como corpo autofágico; (5) corpos autofágicos são degradados por hidrolases vacuolares, e os produtos são liberados no citosol por várias permeases. Adaptado de (Zhao *et al.*, 2019a).

A autofagia é um processo extremamente dinâmico, por isso requer constante ajuste de sua maquinaria em vários níveis de regulação, para manter o tempo apropriado de indução e magnitude de ativação da via dentro da célula. Em leveduras, a regulação da maquinaria de proteínas autofágicas é feita tanto a nível transcricional e pós-transcricional, quanto a nível de modificações pós-traducionais (Delorme-Axford, Daniel and Klionsky, 2018).

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Identificar e caracterizar novos genes envolvidos na homeostase de nutrientes em *C. gattii*.

### 2.2. Objetivos específicos

#### 2.2.1 Capítulo 1:

- Caracterizar o papel de Zrg1 na regulação da homeostase de zinco em *C. gattii*;
- Avaliar os efeitos da ausência de Zrg1 no desenvolvimento das células fúngicas em condições de baixa disponibilidade de nutrientes;
- Analisar o transcriptoma de células mutantes para Zrg1, a fim de identificar o conjunto de genes regulados por essa molécula;
- Avaliar o perfil de expressão gênica existentes em *C. gattii* quando as células são submetidas a condições de privação de zinco;
- Identificar possíveis vias metabólicas em que Zrg1 atua na célula fúngica através da avaliação de enriquecimento gênico;
- Avaliar a influência de Zrg1 na virulência de *C. gattii in vitro* e *in vivo*, utilizando modelos invertebrados de infecção.

#### 2.2.2 Capítulo 2:

- Descrever o papel de Zrg1 na regulação da via autofágica em *C. gattii*;
- Monitorar a autofagia em células de *C. gattii* através da construção de linhagens GFP positivas;
- Avaliar a influência da deleção de Zrg1 na regulação da autofagia em *C. gattii* durante condições de privação de nutrientes;
- Analisar a influência da homeostase de zinco na regulação da autofagia na linhagem de *C. gattii* mutante para Zip1.

### 3. Resultados

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste projeto estão apresentados na forma de dois manuscritos. O primeiro trata da caracterização de Zrg1 e seu papel na regulação do desenvolvimento e virulência de *C. gattii* (Diehl *et al.*, 2021). O segundo capítulo descreve a influência de Zrg1 na manutenção da autofagia em *C. gattii*, o qual está redigido na forma de *Hypothesis* e formatado conforme regras do periódico *mSphere* a ser submetido. As Figuras foram dispostas ao longo do texto a fim de facilitar a leitura e interpretação dos resultados.

**3.1. Capítulo 1: Zrg1, a cryptococcal protein associated with regulation of growth in nutrient deprivation conditions.**

Artigo publicado no periódico *Genomics* em 30 de janeiro de 2021 (Diehl *et al.*, 2021).



## Original Article

## Zrg1, a cryptococcal protein associated with regulation of growth in nutrient deprivation conditions

Camila Diehl<sup>a</sup>, Ane Wichine Acosta Garcia<sup>a</sup>, Uriel Perin Kinskovski<sup>a</sup>, Nicolau Sbaraini<sup>a</sup>, Rafael de Oliveira Schneider<sup>a</sup>, Patricia Aline Gröhs Ferrareze<sup>a</sup>, Alexandra Lehmkuhl Gerber<sup>c</sup>, Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos<sup>c</sup>, Livia Kmetzsch<sup>a,b</sup>, Marilene Henning Vainstein<sup>a,b</sup>, Charley Christian Staats<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil



## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Zinc  
Autophagy  
Forward genetics  
*Cryptococcus*

## ABSTRACT

*Cryptococcus gattii* is one of the causes of cryptococcosis, a life-threatening disease generally characterized by pneumonia and/or meningitis. Zinc is an essential element for life, being required for the activity of many proteins with catalytic and structural roles. Here, we characterize *ZRG1* (zinc-related gene 1), which codes a product involved in zinc metabolism. Transcriptional profiling revealed that zinc availability regulated the expression of *ZRG1*, and its null mutants demonstrated impaired growth in zinc- and nitrogen-limiting conditions. Moreover, *zrg1* strains displayed alterations in the expression of the zinc homeostasis-related genes *ZAP1* and *ZIP1*. Notably, cryptococcal cells lacking *Zrg1* displayed upregulation of autophagy-like phenotypes. Despite no differences were detected in the classical virulence-associated traits; cryptococcal cells lacking *ZRG1* displayed decreased capacity for survival inside macrophages and attenuated virulence in an invertebrate model. Together, these results indicate that *ZRG1* plays an important role in proper zinc metabolism, and is necessary for cryptococcal fitness and virulence.

## 1. Introduction

The socioeconomic and ecological characteristics, as well as the increasing number of populations at risk, are the main determinants of the incidence of fungal disease across the world [1]. One of the most prevalent fungal diseases, cryptococcosis, is generally characterized by meningitis and is mainly caused by two closely related species of encapsulated basidiomycetous yeasts (*Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*) [2]. In the last decade, the incidence of invasive fungal diseases has increased and is associated with 1.5 million deaths. Cryptococcal meningitis accounts for over 220,000 individual cases per year, with 180,000 deaths every year [3].

Pathogenic cryptococcal species share well-characterized virulence determinants: (i) the presence of a polysaccharide capsule, (ii) the synthesis of a melanin-like pigment, (iii) the capability to proliferate at human body temperature, (iv) the production of host-damaging

enzymes, such as urease and phospholipase, and (v) the capability to proliferate inside macrophages [4,5]. Although *C. gattii* accounts for <1% of cryptococcosis cases, the impact of this species resides in its capability to cause serious disease in immunocompetent hosts [6].

Transition metals such as zinc, iron, copper, and manganese play important roles in many biological processes, including redox homeostasis, regulation of gene expression, cell proliferation, and others. Thus, proper regulation of transition metals homeostasis is fundamental for proper fungal fitness in several niches, including the infection sites [7,8]. To counterbalance the infectious process, macrophages and other phagocytes can reduce the availability of nutrients, creating an unfavorable intracellular environment for microbial development. This strategy is known as nutritional immunity [9]. Zinc has emerged as one of the nutrient targets for nutritional immunity, as demonstrated for fungal pathogens as *C. neoformans* [10], *Histoplasma capsulatum* [11], and others [9]. To cope with zinc withholding by the immune system

\* Corresponding author at: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia. Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Bloco IV, Prédio 43421, Laboratório 219. Caixa Postal 15005. Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil.

E-mail address: [staats@ufrgs.br](mailto:staats@ufrgs.br) (C.C. Staats).

<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.01.023>

Received 4 August 2020; Received in revised form 4 December 2020; Accepted 28 January 2021

Available online 30 January 2021

0888-7543/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.



and to survive in adverse conditions during their life cycle, pathogenic fungi express several proteins associated with metal uptake [7,8]. The ZIP family of metal transporters is conserved among the three domains of life and is associated with the mobilization of zinc and other metals from the extracellular space of intracellular compartments to the cytoplasm [12].

We have previously shown in murine models that the regulation of zinc homeostasis is important for the full virulence of *C. gattii*. The transcription factor Zap1 plays a central role in zinc homeostasis by modulating the expression of zinc uptake and storage genes under zinc-limiting conditions [13]. In addition, three paralogs of the ZIP family of metal transporters have been characterized in *C. gattii*. The proteins Zip1 and Zip2 support fungal growth in zinc-limiting conditions and are required for proper cell fitness inside macrophages [14] and amoebas [15]. The protein Zip3, an ortholog of the *Saccharomyces cerevisiae* Golgi membrane transporter Atx2, is associated with manganese and oxidative stress metabolism [44].

The overall zinc homeostasis has mainly been investigated in *S. cerevisiae*. Dozens of proteins are involved in the adaptation of yeast cells to low-zinc environments and the related associated effects (i.e., oxidative stress) [16]. As the majority of such proteins are conserved in cryptococcal genomes [17], it is reasonable to assume that cryptococcal cells would respond to zinc limitation in a similar fashion to that observed in *S. cerevisiae* cells. To find new mechanisms that help cryptococcal cells cope with zinc limitation, we used forward genetics to find new genes associated with zinc metabolism. Here, we present the functional characterization of a zinc-related gene (*ZRG1*) of *C. gattii*, as well as the importance of this gene in zinc homeostasis, growth in nutrient deprivation conditions, and virulence.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains and culture conditions

The *C. gattii* R265 and *C. neoformans* H99 strains were used in this work. These strains were routinely cultured in YPD (2% glucose, 2% peptone, 1% yeast extract) at 30 °C on a constant rotation platform (200 rpm). Agar was added to a final concentration of 1.5% when solid medium was used. YPD plates supplemented with 100 µg/mL nourseothricin were used to select for the *C. gattii* *zrg1* null mutant strains. Phenotypic assays were conducted in yeast nitrogen base (YNB) without amino acids and ammonium sulfate [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] (Difco) or YNB supplemented with asparagine to a final concentration of 40 mM (YNB-Asn). Phagocytosis-related phenotypes were evaluated using the murine macrophage-like RAW 264.7 cell line. The cells were routinely cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Invitrogen) in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2. Insertional transfer DNA (T-DNA) library screening

Almost 8000 individual mutants from a *C. gattii* T-DNA insertional library [18] were screened for defects in development in metal-depleted medium. Each mutant was first incubated in flat-bottom 96-well plates containing 100 µL YPD medium and allowed to grow at 30 °C for 18 h. Each mutant was replica-plated into YNB-Asn, YNB-Asn containing 100 µM diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), or YNB-Asn with 10 µM *N,N,N',N'*-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN). The plates were incubated at 30 °C for up to 48 h. The growth of each mutant was determined by measuring the optical densities at 600 nm with a plate reader. Identification of genes inactivated by T-DNA insertion was conducted using inverse PCR, as previously performed [18].

### 2.3. Construction of *zrg1* null mutant strain

DelsGate (Deletion via Gateway) methodology [19] was used to

construct the *ZRG1* (CNBG\_1485) gene inactivation allele by employing the pDONR-NAT vector [13]. The 5' and 3' *ZRG1* flanking sequences (~1000 bp) were PCR-amplified and gel-purified using a PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen). The plasmid pDONR-NAT and each PCR product were mixed at equimolar ratios in a BP Clonase reaction according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). This reaction was then transformed into *Escherichia coli* OmniMAX 2 T1 cells. The inactivation construct plasmid was linearized by I-SceI digestion prior to *C. gattii* biolistic transformation. The primers used for plasmid construction and screening are listed in Supplementary Table S1. Confirmation of correct integration of the inactivation cassette was performed using *SalI*-digested DNA by Southern analysis (AlkPhos Direct Labelling and Detection System with CDP-Star - GE Healthcare).

### 2.4. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

RNA was isolated by TRIzol (Invitrogen) after cellular lysis by glass beads. RNA integrity and concentration were assessed by electrophoresis on a 0.8% agarose gel and by UV-Vis spectrophotometer analysis using a NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Complementary DNA (cDNA) was prepared from DNase (Promega)-treated total RNA samples (200 ng) with ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega) using oligo-dT. Quantitative PCR (qPCR) was performed on a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with thermal cycling conditions set with an initial step at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s, 55 °C for 15 s, and 60 °C for 60 s. Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) was used as a reaction mix and was supplemented with 5 pmol each primer, 1 µL cDNA template, and 2 µL SYBR Green (1:1000, Invitrogen) for a final volume of 20 µL. All experiments were performed using three independent cultures, and each cDNA sample was analyzed in triplicate for each primer pair. Melting curve analysis was performed at the end of the reaction to confirm the presence of a single PCR product. Data were normalized using the actin gene, which was amplified in each set of PCR experiments. Relative expression was determined by the comparative threshold cycle ( $2^{-\Delta Ct}$  or  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) methods [20]. Statistical analyses were conducted via a two-tailed Student's *t*-test or by one-way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Tukey's test. The primers used in these analyses are listed in Supplementary Table S1.

### 2.5. RNA sequencing (RNA-Seq) analysis

Wild-type (WT) and *zrg1*#219 cells were pre-grown in YPD medium (30 °C, overnight) on a rotary platform (200 rpm). YNB-Asn and YNB-Asn supplemented with 10 µM TPEN were inoculated with  $1 \times 10^7$  cells/mL and incubated for 2 h at 30 °C on a rotary platform (200 rpm) in biological triplicates. Cells were collected by centrifugation (10,000 × *g* for 10 min) and RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen) after cellular lysis by glass beads. RNA integrity and concentration were assessed by electrophoresis on a 0.8% agarose gel and by UV-Vis spectrophotometer analysis using a NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific). mRNA was purified from total RNA samples using a Dynabeads™ mRNA Purification Kit (Thermo Fisher). Purified samples were used for library construction using a TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina). The libraries were sequenced using NextSeq 500/550 Mid-Output Kit v2.5 (Illumina) in a NextSeq 500 Sequencing System (Illumina). Raw data were processed using the Illumina BaseSpace Sequence Hub for deindexing and fastq file recovery. Such files were analyzed using FastQC [21] to remove low-quality reads ( $q < 30$ ). The resulting fastq files were aligned to the *C. gattii* R265 reference sequence (National Center for Biotechnology Information Genome Assembly GCA\_002954075.1) using STAR [22] with the following parameters `-quantMode GeneCounts -outFilterType BySJout -alignIntronMin 10 -alignIntronMax 3000 -outFilterIntronMotifs RemoveNoncanonical`. A count table from each paired-end library was obtained with STAR, using a manually curated annotation of the *C. gattii*



R265 genome [23]. Differential expression was evaluated using DESeq2 [24]. The gene ontology (GO) terms associated with each gene was recovered from eggNOG 5.0 [25] by the eggNOG mapper-tool [26] using default settings. Functional enrichment of differentially expressed genes was performed using topGO [27] with classic Fisher statistics. Only enriched gene ontology (GO) terms with  $p$ -values of  $<0.05$  were considered for further analysis. A fluxogram describing the methods to detect differentially expressed genes and enriched GO terms is presented in Fig. S1. Raw data is available on NCBI SRA (Bioproject PRJNA660754).

## 2.6. Induction of autophagy

The *C. gattii* WT, *zrg1#99*, and *zrg1#219* strains, as well as the *C. neoformans* H99 and *C. neoformans atg7* null mutants [28], were grown in YPD medium (30 °C, overnight) under agitation. The cells were washed twice in distilled water ( $1 \times 10^6$  cells/mL), transferred to starvation medium (YNB) containing phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; 1 mM), and incubated for 3 h at 30 °C. The accumulation of intracellular structures resembling autophagic bodies was monitored through differential interference contrast under an Olympus FV1000 confocal laser scanning microscope. The number of intracellular structures resembling autophagic bodies in each cell was counted using ImageJ software.

## 2.7. Growth assays

The growth capability of mutant cells in zinc-limiting medium was assessed by pre-growing the *C. gattii* R265, *zrg1#99*, and *zrg1#219* in YPD medium (30 °C, overnight) under constant rotation (200 rpm). The cells were then washed with water, and  $1 \times 10^5$  cells were inoculated in 100  $\mu$ L YNB-Asn microplates containing distinct TPEN concentrations. After 24-h incubation at 30 °C, the optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) was determined using a plate reader (SpectraMax i3, Molecular Devices). Alternatively, to evaluate the effect of reversal of TPEN toxicity over mutant cells, a total of  $5 \times 10^3$  cells/mL were inoculated in 100  $\mu$ L YNB-Asn added or not of TPEN (10  $\mu$ M) with distinct metallic ions ( $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ , and  $Cu^{2+}$ ) at 20  $\mu$ M. Plates were incubated for up to 72 h (30 °C, 200 rpm) and the  $OD_{600}$  of each culture was determined every 24 h.

The growth capabilities of mutant cells in nutrient-limiting media were assessed by pre-growing the *C. gattii* R265, *C. gattii zrg1#99*, *C. gattii zrg1#219*, *C. neoformans* H99, and *C. neoformans atg7* cells in YPD medium (30 °C, overnight). The cells were then washed with water, and  $5 \times 10^3$  cells/mL were inoculated in YNB or YNB-Asn medium. Growth was evaluated by the  $OD_{600}$  after several intervals up to 72 h of incubation at 30 °C.

## 2.8. Macrophage assays

Phagocytosis assays were conducted to evaluate the susceptibility of the mutant strains to macrophage phagocytosis activity and the resistance of the strains to the antifungal action of phagocytes. One day before the phagocytosis test, an aliquot of  $1 \times 10^5$  RAW 264.7 cells (Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRJ code 0212) in DMEM supplemented with 10% FBS was seeded into 96-well culture plates and incubated at 37 °C with 5%  $CO_2$ . The *C. gattii* strains were inoculated into YPD medium and allowed to grow at 30 °C for 18 h. The next day, the fungal cells were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and opsonized with the anti-GXM (glucuronoxylomannan) antibody 18B7 (1  $\mu$ g/mL, 1 h at 37 °C). Macrophages were activated with 100 U/mL interferon ( $INF$ )- $\gamma$  (Sigma) and 500 ng/mL lipopolysaccharide (LPS, Sigma) for 18 h at 37 °C with 5%  $CO_2$ . After opsonization, a total of  $1 \times 10^5$  cells were added to the wells containing the macrophages and incubated for 2 h at 37 °C with 5%  $CO_2$ . The wells were then washed three times with PBS, and one set of wells was treated with 0.1% Triton X – 100 to lyse macrophage-like cells, and the fungal loads were

determined by colony-forming unit (CFU) analysis in YPD medium. The other set of washed wells received 100  $\mu$ L fresh DMEM and was further incubated at 37 °C with 5%  $CO_2$ . After 24-h incubation, the wells were washed three times with PBS and treated with 0.1% Triton X – 100 to lyse macrophage-like cells. The fungal load in the macrophages was determined, and the intracellular proliferation rate (IPR) was calculated as the ratio between the fungal loads at 24 and 2 h.

## 2.9. Virulence assays in *Tenebrio molitor*

Larvae of the beetle *T. molitor* were acquired from a local bird food dealer. The larvae were infected with cryptococcal cells according to a previous report, and using a Hamilton syringe (701 N, 26 gauge, 10- $\mu$ L capacity) [29]. Briefly, 15 individuals, showing light and uniform color and absence of pigmented spots, were injected with 5  $\mu$ L cell suspensions containing  $1 \times 10^6$  cells of *C. gattii* WT or *zrg1* null mutants. Injection with the same volume of sterile PBS was used as the control. All larvae were placed in sterile Petri dishes and maintained at 37 °C with daily monitoring of mortality up to 10 days.

## 2.10. Virulence determinants assays

Capsule size was examined by microscopy after incubation for 24 h (37 °C and 5%  $CO_2$ ) in DMEM media with 10% FBS. Cells were collected and counter-stained with India ink. Relative capsule sizes were defined as the ratio between the capsule thickness and cell diameter. ImageJ software was utilized to determine the capsule measurements of 100 cells of each strain. Melanization was evaluated by growth of cryptococcal strains in a solid minimal medium (15 mM glucose, 10 mM  $MgSO_4$ , 29.4 mM  $KH_2PO_4$ , 3  $\mu$ M thiamine, pH 5.5), with 1 mM L-DOPA (Sigma-Aldrich) for up to 72 h and photographed. Alternatively, liquid cultures in the same medium were performed and the supernatant was evaluated spectrophotometrically ( $OD_{400}$  and  $OD_{492}$ ) in order to quantify released pigments.

## 2.11. Statistical analysis

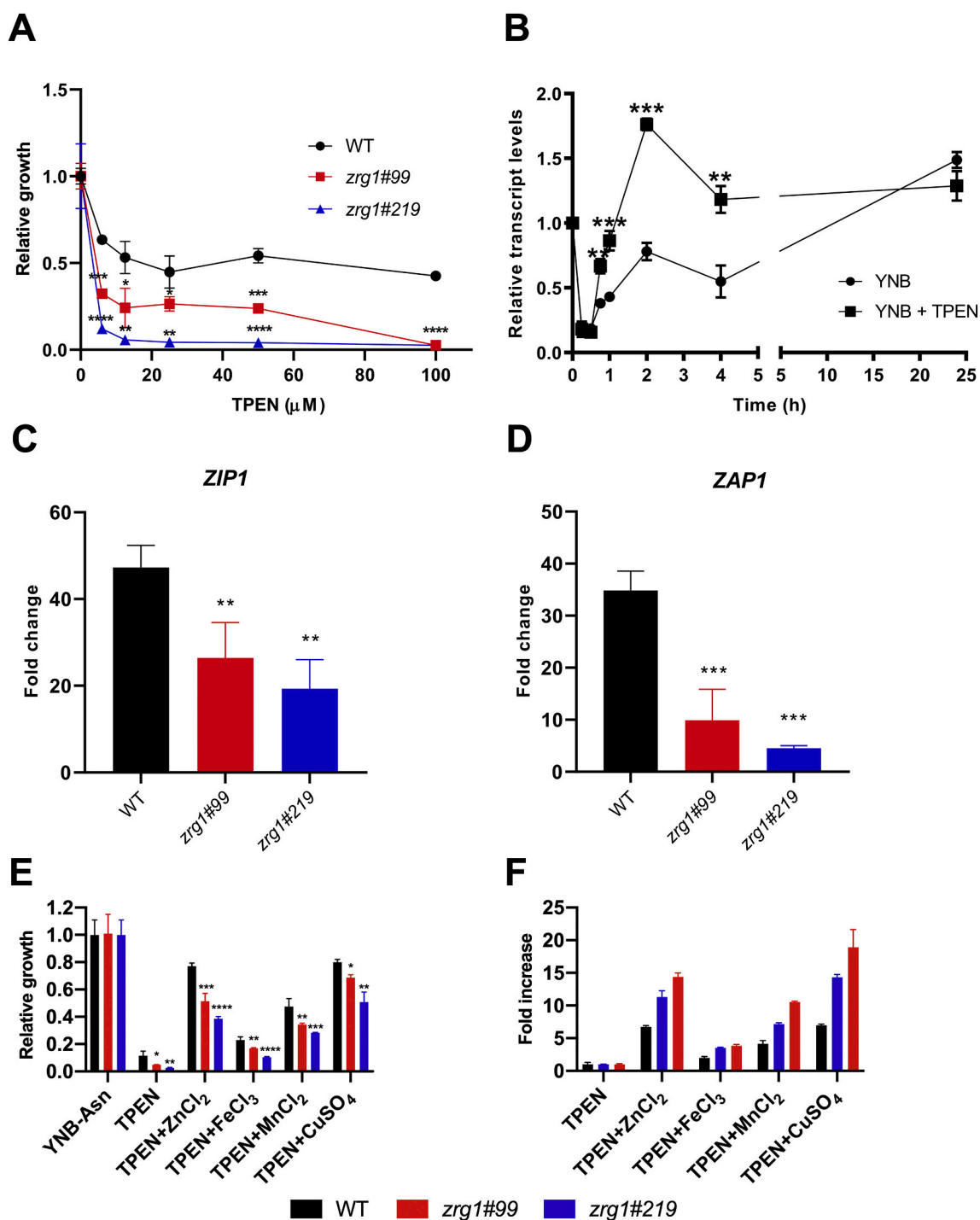
Statistical differences were analyzed using an unpaired  $t$ -test or one-way ANOVA. All values are reported as the means and the standard error (SD). Survival curves were analyzed using the log-rank (Mantel–Cox) test.

## 3. Results

### 3.1. Identification of ZRG1 as a zinc-associated gene in *C. gattii*

To identify new genes possibly involved in zinc metabolism in *C. gattii*, we employed a forward genetics approach, screening a T-DNA random insertion mutant library generated in the *C. gattii* R265 strain [18]. The growth capability of each mutant of this library was independently evaluated in the presence of two metal chelators: TPEN and DTPA. Only mutants that displayed a consistent reduction (90%) of relative growth when compared to the WT were considered hypersensitive to metal chelation. Only one mutant displayed sensitivity to both TPEN and DTPA (data not shown). Using inverse PCR, we found that the gene CNBG1485 was interrupted by the T-DNA insertion event (Fig. S2). This gene was named zinc-related gene 1 (ZRG1), which encodes a protein with 1122 amino acids and has a predicted molecular mass of 124 kDa. InterProScan analysis performed in the FungiDB database [30] found no conserved domain. Location prediction, performed with BUSCA [31], revealed a potential cytoplasmic (score = 0.7) or nuclear (score = 0.3) location for Zrg1.

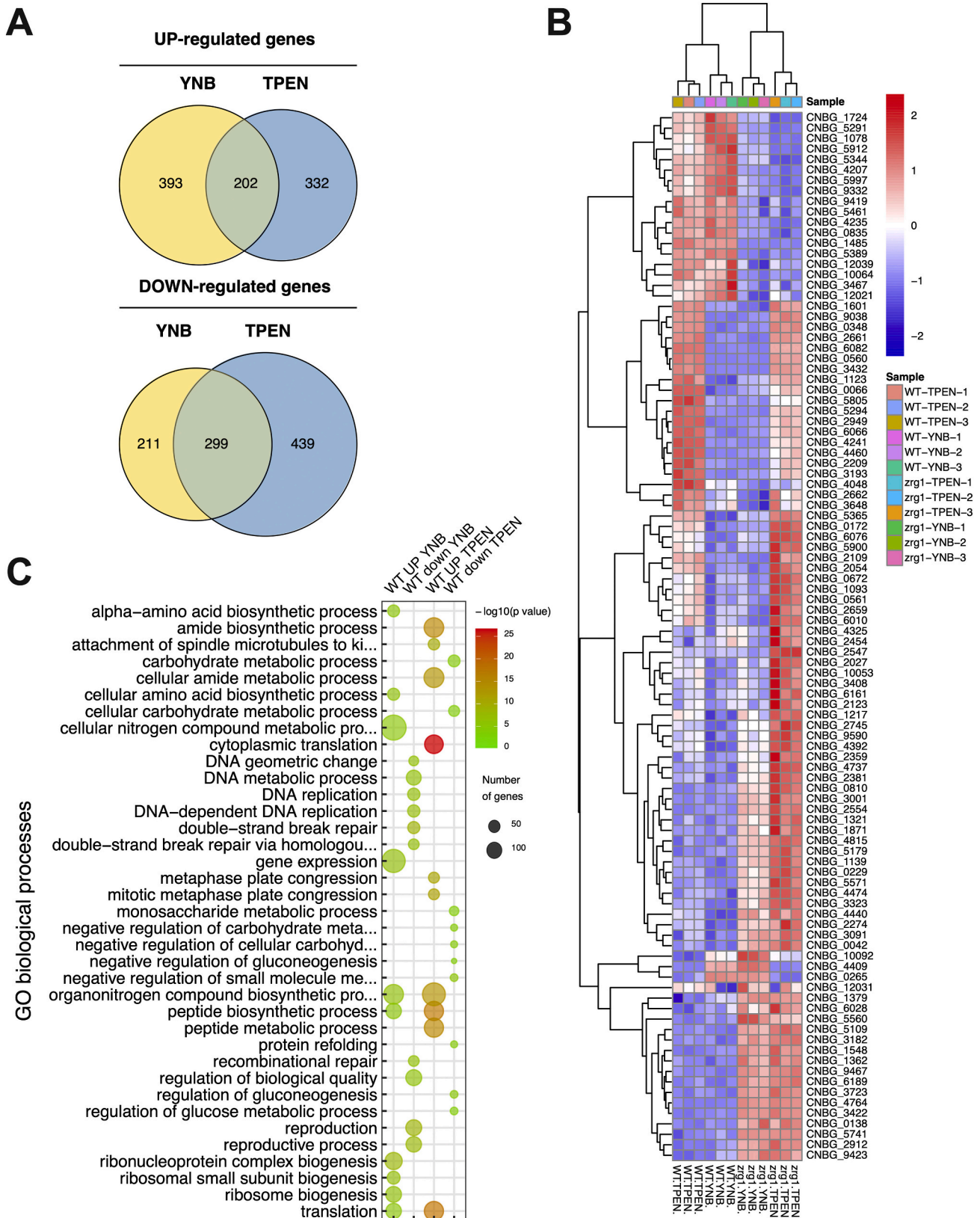
As the Zrg1 phenotypes associated with metal metabolism were derived from a T-DNA insertion mutant, we generated null mutants of ZRG1 by allelic replacement of the region containing the coding sequence. Among near 200 distinct transformants, only two



**Fig. 1.** *ZRG1* is a cryptococcal gene related to zinc metabolism. (A) Growth of the WT and two *zrg1* null mutant strains in YNB-Asn with 0–100  $\mu\text{M}$  TPEN was evaluated spectrophotometrically. The ratio between growth in YNB-Asn + TPEN and control (YNB-Asn) conditions is shown as the mean  $\pm$  SD from three biological replicates. (B) Time course analysis of *ZRG1* gene transcripts using RT-qPCR after *C. gattii* was grown in YNB-Asn or YNB-Asn supplemented with TPEN (10  $\mu\text{M}$ ). (C, D) RT-qPCR of *ZIP1* (C) and *ZAP1* (D) gene transcripts after *C. gattii* was grown in YNB-Asn or YNB-Asn supplemented with TPEN (10  $\mu\text{M}$ ). The measured quantity of mRNA in each sample was normalized using the Ct values obtained for the *ACT1* gene. Fold change represents the ratio between the transcript levels in TPEN and the control (YNB-Asn) conditions. (E) Growth of the WT and the two *zrg1* null mutant strains in YNB-Asn, YNB-Asn + TPEN (10  $\mu\text{M}$ ) added or not of differential metal salts (20  $\mu\text{M}$ ) was evaluated after 48 h and normalized to each strain cell counts in YNB-Asn. (F) Fold increase was calculated by the normalization of relative growth of each strain in distinct conditions to TPEN condition, as obtained in (E). Data shown are the mean  $\pm$  SD from three experimental replicates of three biological replicates. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; denote statistically significant differences compared to the WT levels (one-way ANOVA).

independent mutants displayed the correct genotype, as evaluated by Southern blotting (Fig. S2). Despite several attempts, we could not generate fully functional complemented mutant strains harboring the WT *ZRG1* locus, either employing homologous site recombination or

ectopic integration. In this manner, our hypothesis-driven experiments were conducted in two independent null mutants, and the phenotypic alterations considered were only those observed in both mutants. The sensitivity of the generated null mutants to zinc-limiting conditions was



**Fig. 2.** Zrg1 regulates the expression of genes related to gene expression and protein synthesis. (A) Quantitative Venn diagram showing the extent of shared differentially expressed genes when comparing the transcriptome of WT and *zrg1#219* null mutant in YNB-Asn or YNB-Asn + TPEN. (B) Heatmap of the top 100 genes with most variant expression. (C) Top 10 enriched functional GO biological processes of Zrg1 positively and negatively regulated genes in YNB-Asn or YNB-Asn + TPEN.

**Table 1**  
Expression levels of ATG genes identified in *C. gattii* genome.

| Gene         | <i>C. neoformans</i> ID | <i>C. gattii</i> ID | YNB-Asn      |                | YNB-Asn + TPEN |                |
|--------------|-------------------------|---------------------|--------------|----------------|----------------|----------------|
|              |                         |                     | Log2FC       | q-value        | Log2FC         | q-value        |
| <b>ATG1</b>  | <b>CNAG_05005</b>       | <b>CNBG_4675</b>    | <b>-1,98</b> | <b>1,6E-08</b> | <b>-1,87</b>   | <b>3,3E-08</b> |
| <b>ATG2</b>  | <b>CNAG_06732</b>       | <b>CNBG_6113</b>    | <b>-1,78</b> | <b>6,0E-14</b> | <b>-1,72</b>   | <b>2,6E-13</b> |
| ATG3         | CNAG_06892              | CNBG_3760           | -0,49        | 1,9E-03        | -0,87          | 5,0E-09        |
| ATG4         | CNAG_02662              | CNBG_3127           | -0,74        | 1,9E-04        | -0,94          | 7,1E-07        |
| ATG5         | CNAG_06519              | CNBG_4953           | 0,03         | 9,4E-01        | 0,03           | 9,3E-01        |
| ATG6         | CNAG_01773              | CNBG_3308           | -0,40        | 6,5E-02        | -0,51          | 7,7E-03        |
| ATG7         | CNAG_04538              | CNBG_2532           | -0,98        | 7,0E-05        | -0,15          | 5,9E-01        |
| ATG8         | CNAG_00816              | CNBG_1122           | -0,10        | 7,9E-01        | -0,09          | 8,1E-01        |
| <b>ATG9</b>  | <b>CNAG_01445</b>       | <b>CNBG_5852</b>    | <b>-1,69</b> | <b>2,9E-05</b> | <b>-0,41</b>   | <b>3,1E-01</b> |
| <b>ATG11</b> | <b>CNAG_01424</b>       | <b>CNBG_5944</b>    | <b>-1,83</b> | <b>6,2E-22</b> | <b>-1,85</b>   | <b>6,8E-24</b> |
| ATG12        | CNAG_07645              | CNBG_5369           | 0,13         | 6,9E-01        | 0,26           | 3,9E-01        |
| <b>ATG13</b> | <b>CNAG_00778</b>       | <b>CNBG_1152</b>    | <b>-1,11</b> | <b>8,8E-09</b> | <b>-0,83</b>   | <b>1,4E-05</b> |
| ATG14 – 03   | CNAG_03608              | CNBG_0014           | -0,09        | 7,3E-01        | -0,39          | 6,2E-02        |
| ATG14-05     | CNAG_05500              | CNBG_4372           | -0,16        | 5,4E-01        | -0,25          | 2,7E-01        |
| <b>ATG15</b> | <b>CNAG_01601</b>       | <b>CNBG_3840</b>    | <b>-0,75</b> | <b>1,4E-02</b> | <b>-1,78</b>   | <b>3,6E-10</b> |
| ATG16        | CNAG_02576              | CNBG_3205           | -0,46        | 7,4E-02        | -0,95          | 6,8E-05        |
| ATG18        | CNAG_02269              | CNBG_3984           | -0,50        | 8,9E-02        | -0,80          | 3,4E-03        |
| ATG20        | CNAG_02730              | CNBG_3393           | -0,74        | 1,2E-03        | -0,86          | 8,4E-05        |
| ATG22        | CNAG_07685              | CNBG_1612           | <b>-1,02</b> | <b>1,1E-02</b> | <b>-0,04</b>   | <b>9,3E-01</b> |
| ATG24        | CNAG_01554              | CNBG_3882           | 0,17         | 5,4E-01        | -0,25          | 3,5E-01        |
| ATG26        | CNAG_12261              | ND                  | ND           | #N/A           | ND             | ND             |
| ATG27        | CNAG_04406              | CNBG_2644           | 0,25         | 3,7E-01        | 0,16           | 5,7E-01        |
| ATG101       | CNAG_07646              | CNBG_9586           | -0,61        | 1,9E-01        | -0,49          | 2,8E-01        |

Genes with significant differential expression are in bold.

evaluated by culturing the WT, *zrg1*#99, and *zrg1*#219 for 24 h in YNB-Asn supplemented with a range of TPEN concentrations. There was significant reduction in the growth capabilities of the cells lacking *ZRG1* in TPEN concentrations as low as 10  $\mu$ M (Fig. 1A).

Next, we sought to determine if zinc availability regulates *ZRG1* expression, as already demonstrated for the master zinc regulator *ZAP1* in *C. gattii* [13]. Transcriptional profiling of the *ZRG1* gene was conducted in a time course-fashion from *C. gattii* WT cells cultured in YNB-Asn or YNB-Asn containing TPEN for up to 24 h. A significant increase in *ZRG1* transcript levels was detected when the cells were cultured in the presence of TPEN compared to the control condition. Such differences could be found between 45 min and 4 h, with peak expression observed after 2 h of exposure to TPEN (Fig. 1B). The reduced growth observed in *zrg1* null mutants could be derived from alterations in the expression of genes involved in the regulation, uptake, and homeostasis of zinc metabolism. Thus, the expression of the main zinc transporter *ZIP1* [14] and the zinc master regulator *ZAP1* [13] was evaluated after a period of incubation for 2 h in YNB-Asn containing TPEN. The mutant strains had a reduction in the transcript levels of *ZIP1* (Fig. 1C) and *ZAP1* (Fig. 1D) compared to the WT strain.

In order to evaluate whether the observed hypersensitivity of cells lacking *ZRG1* to TPEN could be associated with decreased bioavailability of other metallic ions, we analyzed the growth capabilities of such cells in the presence of TPEN (10  $\mu$ M) and a twofold excess of  $ZnCl_2$ ,  $FeCl_3$ ,  $MnSO_4$ , and  $CuSO_4$ . None of the added metals could totally revert the toxic effects of TPEN, even in WT cells (Fig. 1E). However, both zinc and copper were the most effective metals in the recovery of growth capabilities of such strains. A near 7-fold increase in the relative growth in WT cells could be observed when zinc or copper chloride were added to TPEN-medium. However, the observed recovery was even higher in the mutant cells (Fig. 1F). No toxic effects could be observed by such metals alone in YNB-Asn to both WT and mutant cells (Fig. S3). As copper and zinc can both be chelated by TPEN, we assessed whether the partial reversal of the TPEN toxic effect was caused by the chelation balance shift between zinc and copper or whether it was due to an intrinsic activity of copper. We analyzed the effect of a copper chelator (BCS - bathocuproine sulphonate) in growth capability of WT and *zrg1* mutant cells. No statistical differences could be observed between such cells in a wide range of TPEN concentrations evaluated (up to 50  $\mu$ M –

Fig. S3). Collectively, these results link *Zrg1* to zinc and, possibly copper, metabolism in cryptococcal cells.

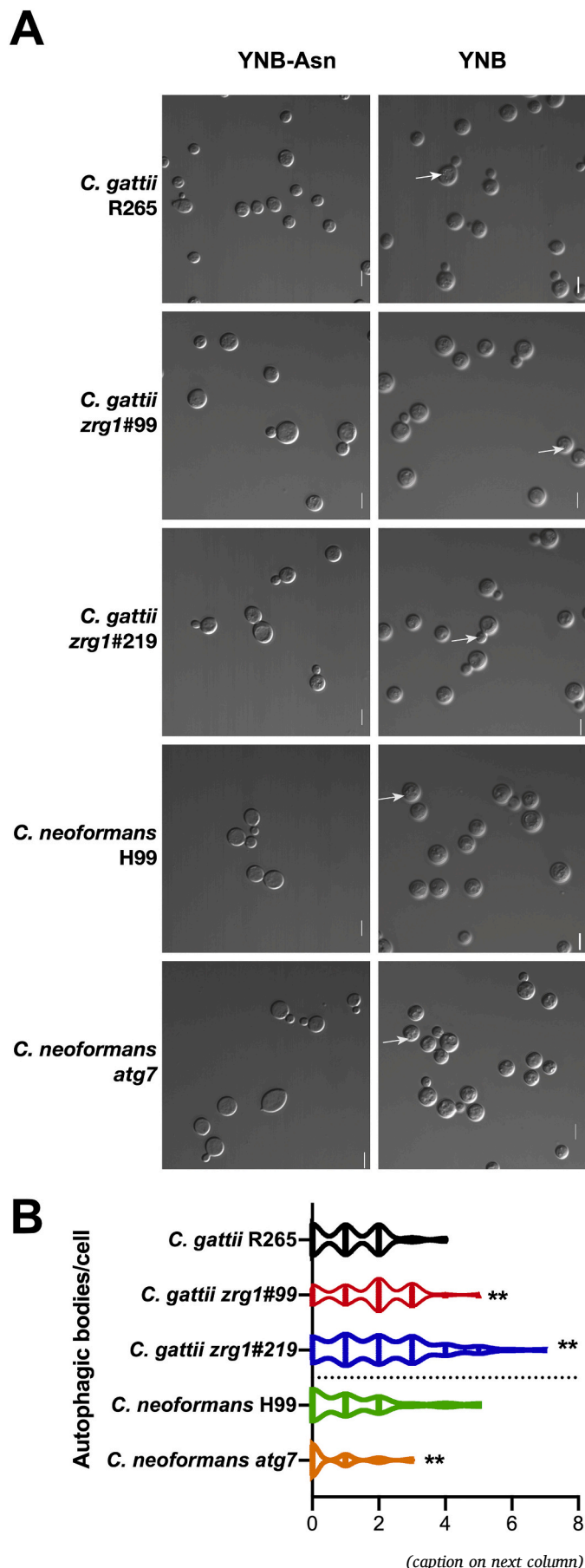
### 3.2. *Zrg1* regulates the expression of genes associated with cellular homeostasis

To evaluate the set of genes potentially regulated by *Zrg1*, we performed RNA-Seq analysis using RNA isolated from WT or *zrg1*#219 null mutant cells exposed for 2 h to TPEN. This condition was chosen as it promoted the highest *ZRG1* expression (Fig. 1B). We also performed such analysis using RNA collected from cells cultured in YNB-Asn for 2 h as a control condition. Both conditions used biological triplicates. Principle component analysis showed a clear separation between the conditions analyzed and an acceptable degree of variability among the biological replicates (Fig. S4). Using a stringent criterion for detecting differentially expressed genes ( $|\log_2FC| \geq 1$ , FDR-corrected  $p$ -value  $< 0.01$ ) we found that *Zrg1* regulated the expression of 1105 genes when the cells were cultured in YNB-Asn, and 1272 genes when the cells were obtained from YNB-Asn + TPEN conditions. Approximately half of the genes were positively regulated (Fig. 2A, Table S2). A total of 501 genes was detected in both conditions (YNB-Asn and TPEN). Clustering analysis of the 100 genes with the most variant expression revealed a clear pattern of expression dependent on the presence of *ZRG1* and the lower availability of metals caused by TPEN presence (Fig. 2B). Functional profiling of *Zrg1*-regulated genes was conducted with GO enrichment analysis. Using *Zrg1* positively regulated genes, we found that several processes associated with gene expression and translation were reduced in cryptococcal cells lacking *zrg1* in YNB-Asn or YNB-Asn containing TPEN (Fig. 2C, Table S3). However, when the sets of negatively regulated genes were analyzed in the two conditions evaluated (YNB-Asn and YNB-Asn + TPEN), processes associated with DNA replication and carbohydrate metabolism were found (Table S3). In this manner, it is feasible to assume that cells lacking *ZRG1* display alterations in the cell metabolism irrespective of the presence of zinc.

### 3.3. *Zrg1* is potentially associated with autophagy in response to nutrient deprivation

Autophagy is one of the several processes that regulate protein





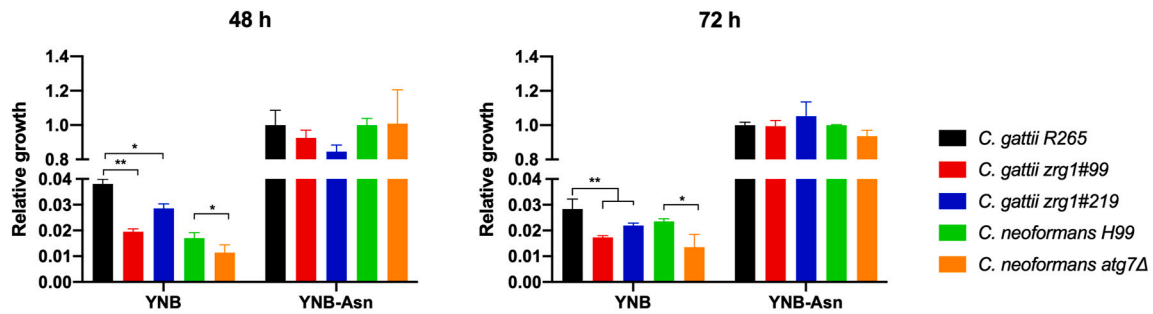
**Fig. 3.** Effects of *ZRG1* absence generate an autophagy-like phenotype in cryptococcal cells. (A) Microscopic evaluation of *C. gattii* R265, *zrg1*#99, *zrg1*#219, and *atg7*Δ strains grown in YNB-Asn (containing nitrogen sources) or YNB [without amino acids and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> supplementation] in the presence of PMSF allowed the identification of structures that resemble autophagic bodies in nitrogen-scarce conditions. Scale bars = 5 μm. (B) Quantification of intracellular structures resembling autophagic bodies. Data are shown as violin plots depicting the median and interquartile range. \*\**p* < 0.01 denotes statistically significant differences compared to WT levels (Student *t*-test).

synthesis in eukaryotic cells [32]. As the RNA-Seq results for *zrg1* null mutant cells pointed to decreased expression of genes with GO terms related to protein synthesis and protein fate (i.e., translation, ribosome assembly, protein targeting to the endoplasmic reticulum [ER]), we evaluated whether cells lacking Zrg1 could be affected in the autophagic process. First, the set of autophagy-related genes (*ATG*) were identified in the genome of *C. gattii* (Table 1) and their expression levels recovered from RNA-Seq data: *ATG1*, *ATG2*, *ATG9*, *ATG11*, and *ATG13* expression in the *zrg1* mutant strain was increased when compared to WT cells in YNB-Asn as well as culture conditions. In the same line, the expression levels of *ATG1*, *ATG2*, and *ATG11*, as well as *ATG15* were increased in the *zrg1* mutant strain when compared to WT cells in the YNB-Asn + TPEN culture condition (Table 1, boldface). This led us to hypothesize that Zrg1 could potentially participate in regulating the autophagic process in *C. gattii*. In yeast cells, autophagy results in the accumulation of intracellular structures resembling autophagic bodies in response to nutrient-deficient conditions, and the lack of Atg proteins decreases or even abolishes the presence of such structures [28]. Thus, the presence of autophagic bodies in the WT strains of *C. gattii* (R265) and *C. neoformans* (H99), and both *zrg1* null mutants was evaluated, together with the *C. neoformans atg7* null mutant (negative control), for proper visualization and comparison of autophagic bodies. Cultivation of cryptococcal cells in YNB without amino acids and without (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> initiates the autophagic process, and the presence of a serine protease inhibitor (PMSF) allows the visualization of such structures [28]. Under these culture conditions, the *C. gattii* R265 and *C. neoformans* H99 strains efficiently formed intracellular structures that resembled autophagic bodies (Fig. 3A), while the null mutants (*zrg1*#99 and *zrg1*#219) displayed a higher number of autophagic bodies (Fig. 3B). These results suggest that cells lacking Zrg1 harbor possible defects in the autophagic process.

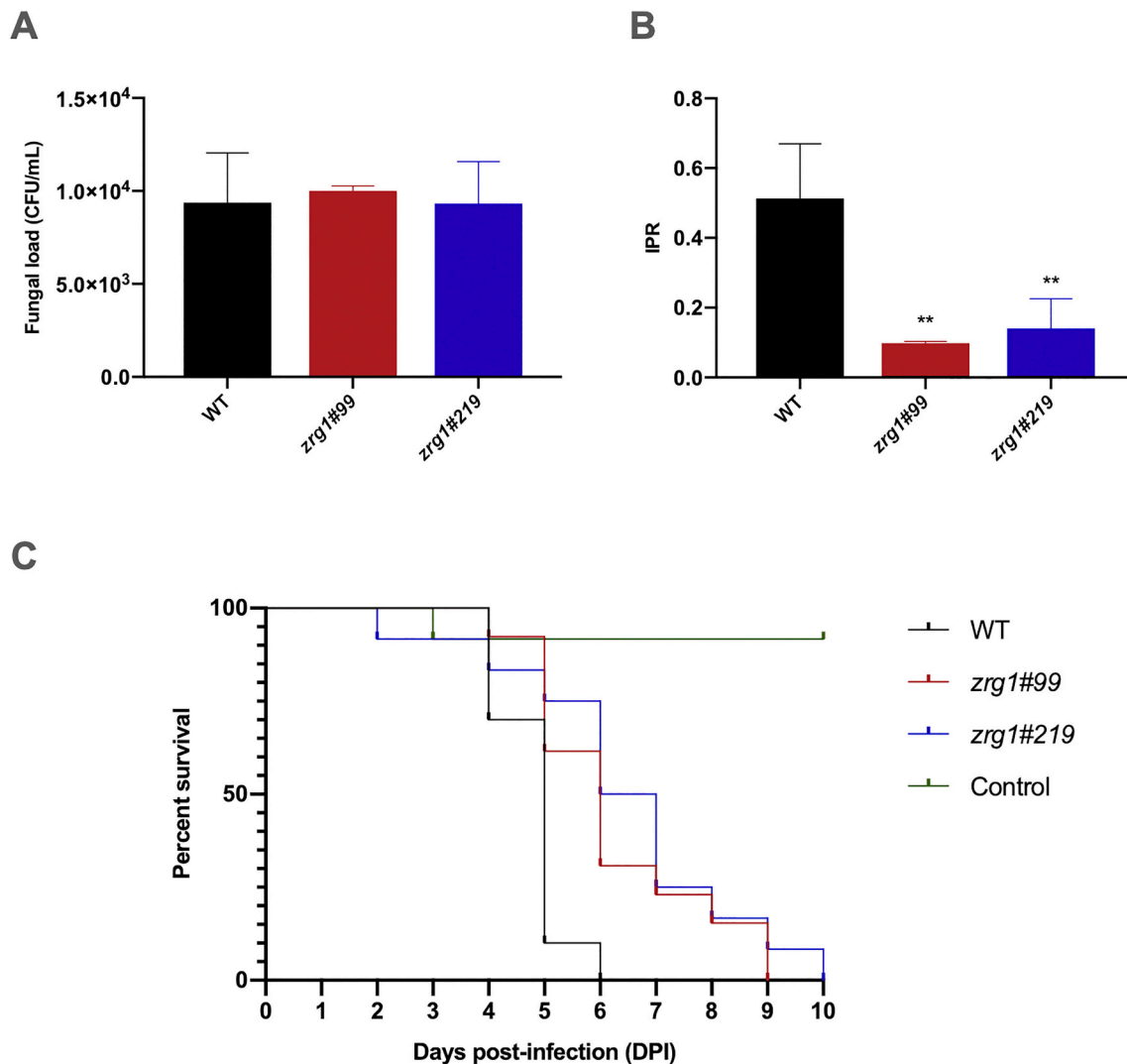
As the null mutants for several *ATG* genes displayed altered capability to grow in nutrient-depleted medium [33], including the genes that displayed altered expression in the *zrg1* null mutants (*ATG1*, *ATG2*, *ATG9*, *ATG13*, and *ATG15* – Table 1), we evaluated the growth capabilities of *zrg1* null mutants in a defined medium containing asparagine (YNB-Asn) as a source of nitrogen, or that was depleted of nitrogen sources (YNB) after incubation for 48 and 72 h. As a comparison control, we included the *C. neoformans* H99 and *atg7* null mutant. In the YNB condition, a growth decrease could be detected in the *zrg1* and *atg7* null mutants compared to its respective WT strains. However, no significant differences were found in the growth capabilities of such mutants compared to WT cells in YNB-Asn (Fig. 4), reinforcing the possible association of Zrg1 with autophagic process regulation in response to nitrogen deprivation.

#### 3.4. Effects of *ZRG1* absence on *C. gattii* virulence

Previous studies from our group have demonstrated that nutrient acquisition is important for *C. gattii* virulence [13,14] and that a nutrient deprivation environment was observed during infection of mice by cryptococcal cells [34]. As Zrg1 putatively regulates the expression of genes related to zinc and cell homeostasis, we hypothesized that the absence of Zrg1 would also affect cryptococcal virulence. We first evaluated whether the lack of Zrg1 would change the outcome from the interaction of host cells. Using the macrophage-like RAW 264.7 cell line,



**Fig. 4.** Zrg1 regulates growth in nutrient-limited medium resembling the autophagic process. The *C. gattii* R265 (WT), *C. gattii* zrg1#99, *C. gattii* zrg1#219, as well as the *C. neoformans* H99 (WT) and the *C. neoformans* atg7 strains were incubated in YNB and YNB-Asn. The cell density was spectrophotometrically determined at 48 and 72 h. The growth in the distinct media of the WT and the mutants is shown as the normalized mean  $\pm$  SD of three biological replicates to the growth of WT strains in YNB-Asn. \*  $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  denotes statistically significant differences compared to the respective WT levels (Student *t*-test).



**Fig. 5.** Zrg1 is required for full *C. gattii* virulence. (A) The phagocytosis index was determined by analyzing the fungal load in host cells after 2-h interaction of *C. gattii* (WT, zrg1#99, zrg1#219) cells with PMA (phorbol myristate acetate)-activated RAW 264.7 macrophage-like cells. (B) The intracellular proliferation rate (IPR) was determined as the ratio between the fungal loads at 24 h and 2 h of incubation with activated RAW 264.7 cells. Data shown are the means  $\pm$  SD for three biological replicates. One-way ANOVA followed by Tukey multicomparison test was performed. \*\* $p < 0.01$  denotes statistically significant differences compared to the WT. (C) Survival curve for determining virulence in vivo. A total of  $10^6$  cells per strain were inoculated in *T. molitor* larvae ( $n = 15$ ). The larvae were maintained at 37 °C with daily monitoring of mortality for up to 10 days. The survival curves were analyzed using the log-rank (Mantel–Cox) test.

we found that, after 2 h interaction, cells lacking *ZRG1* did not display significant differences compared to WT in terms of the fungal loads in the cells (Fig. 5A). This was followed by the absence of detectable alterations in the cryptococcal cell surface structures that mediate recognition by phagocytic cells in the *zrg1* genotype. Despite no alterations in important virulence determinants (i.e., melanin, polysaccharide capsule size, and growth at 37 °C; Fig. S5), cells lacking *ZRG1* displayed decreased survival capability after 24 h incubation with macrophages (Fig. 5B).

In line with the reduced capability to survive to macrophage anti-fungal activity, we sought to determine if the absence of Zrg1 would also affect cryptococcal virulence. Using an invertebrate model of cryptococcosis [29], we found that *T. molitor* larvae infected with *zrg1* null mutants survived longer than those infected with the WT strain ( $p < 0.01$ ) (Fig. 5C), confirming the putative role of *ZRG1* on *C. gattii* virulence.

#### 4. Discussion

Fungal diseases are a global public health problem and pose a serious threat to people with weakened immune systems [35]. For example, cryptococcal meningitis causes more deaths than tuberculosis in some countries with high HIV prevalence [3]. This is worsened by antifungal resistance and the lack of suitable strategies for circumventing this problem [36]. In this context, better knowledge of the essential processes in *Cryptococcus* biology can lead to new approaches for treating the disease. By screening a library of *C. gattii* T-DNA insertional mutants to identify new genes involved in zinc metabolism, we identified a mutant that shows hypersensitivity to DTPA and TPEN. The gene disrupted in this strain, which we have named zinc-related gene 1 (*ZRG1*), codes a product that did not display any conserved domains, which did not allow us to evaluate the mechanisms related to zinc homeostasis based on sequence analysis-driven hypothesis.

Zinc is an essential cofactor in many proteins, and several genes important for zinc metabolism have been described [16,37]. Zap1 is a transcription factor and major player in the response to zinc deficiency, controlling the expression of genes required for zinc uptake and mobilization. A major response to Zap1 activation is the increased expression of transporters involved in zinc uptake, such as the plasma membrane proteins Zrt1 and Zrt2 [16]. In *Cryptococcus* spp., two members of ZIP family transporters have been functionally characterized (*ZIP1* and *ZIP2*). Zip1 is phylogenetically related to *S. cerevisiae* Zrt1 and is the main zinc transporter in *C. gattii*. *ZIP1* transcript levels are highly modulated by zinc availability [14]. Three central evidences support the association between Zrg1 and zinc homeostasis: (i) *ZIP1* and *ZRG1* have similar expression patterns of response to zinc deprivation; (ii) *zrg1* null mutants display decreased transcript levels of *ZAP1* and *ZIP1* when compared to the WT, and point to a potential regulatory function of Zrg1; (iii) *zrg1* null mutants display decreased growth in zinc depletion conditions.

To understand the molecular mechanisms associated with cell growth defects in cells lacking *ZRG1*, RNA-Seq was performed to compare WT and *zrg1* null mutant cells in control and zinc-limiting conditions. The results reinforced the potential regulatory function of Zrg1 and indicated that several genes, potentially regulated by Zrg1, are related to autophagy. Notably, autophagy is a cellular process activated in response to adverse environment conditions, such as nutrient deprivation. *ATG* have been identified in fungi, and many have homologs in animals, revealing that both the molecular machinery and the mechanism of autophagy are highly conserved [38]. Recently, a set of 23 cryptococcal *ATG* genes were identified and characterized. Null mutants for each of these genes were generated, and the majority displayed conserved functions with the *ATG* genes found in *S. cerevisiae*, such as reduced growth in nitrogen-depleted medium [33]. RNA-Seq data revealed that some *ATG* genes were differentially expressed in *zrg1* null mutants, which would explain the apparent abnormal induction of

autophagy (altered number of autophagic bodies) observed in these strains. Moreover, such cells displayed similar growth defects in conditions that induce autophagy (i.e., nitrogen-poor medium), as observed in cells lacking *ATG* genes. Thus, it is feasible to suggest that Zrg1 participates in regulating autophagy in cryptococcal cells.

In *S. cerevisiae* cells, zinc depletion is a trigger of non-selective autophagy, an important phenotype necessary for yeast growth in zinc-limited conditions. This leads to the degradation of some zinc-binding proteins, allowing the zinc pools to be directed to essential proteins. However, this phenotype is not directly related to Zap1 [39]. In fact, analysis of the *ATG* genes in a *S. cerevisiae* library of 139 DNA-binding protein mutants led to the identification of Gat1p, Gcn4p, and Gln3p as positive regulators of autophagy. Spt10p and Fyv5p were also identified as transcriptional repressors of autophagy [40]. Despite the conservation of *S. cerevisiae* *ATG* genes in several eukaryotes, particularities in autophagy machineries among different species reflect the existence of additional autophagy-related genes. This is the case of the choline transporter-like 1 (Ct11) and fasciclin containing-domain (Fsc1) proteins of *Schizosaccharomyces pombe*, whose functions in the regulation of autophagy are associated with the organization of the pre-autophagosomal structure (PAS) and autophagosome fusion with vacuoles, respectively [41]. Similarly, we have identified here that Zrg1 is a potential non-canonical regulator of autophagy (conserved only in *Cryptococcus* species). These results reinforce the assumption that distinct species have evolved specific mechanisms for addressing nutrient-restricted environments, employing autophagic processes to survive and recycle resources in these conditions.

In *Cryptococcus* species, nutrient acquisition and proper regulation of the autophagic process are necessary for properly producing virulence determinants and for infecting hosts [14,42]. Although the absence of Zrg1 did not alter pivotal virulence determinants, such as melanin production and capsule and growth at human body temperature, deleting the gene influence zinc uptake and homeostasis, as well as the potential recycling of zinc resources through autophagy. Hence, it is feasible to assume that the lower capacity for surviving inside macrophages and the reduced virulence in the invertebrate model of cryptococcosis were possibly caused by the effects of the absence of Zrg1 in zinc metabolism and autophagy. In *Galleria mellonella* models of cryptococcosis, the absence of the majority of *C. gattii* *ATG* genes leads to reduced, or even avirulent, phenotypes [33]. Moreover, *atg7* null mutants displayed attenuated virulence in mouse models [42].

In conclusion, we describe a new cryptococcal gene that putatively has major functions in zinc homeostasis, growth in nutrient-limited (zinc and nitrogen starvation) conditions, and virulence. However, the exact molecular mechanisms associated with these phenotypes remain to be elucidated.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.01.023>.

#### Acknowledgments

We thank Arturo Casadevall for providing the GXM antibody (monoclonal antibody [Mab] 18B7). This work was supported by grants from the Brazilian agency Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (404141/2016–1 and 309897/2017–3). We acknowledge support from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). This project was also funded by the Advanced Network of Computational Biology (RABICÓ, Biocomputacional Grant 23038.010041/2013-13) from CAPES. We also thank the CME – UFRGS for the confocal and scanning electron microscopy analysis, as well as Henrique Biehl and Diego Muszinski for technical assistance.



## References

- [1] Y.-L. Chang, S.-J. Yu, J. Heitman, M. Wellington, Y.-L. Chen, New facets of antifungal therapy, *Virulence*. 8 (2017) 222–236, <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1257457>.
- [2] R.C. May, N.R.H. Stone, D.L. Wiesner, T. Bicanic, K. Nielsen, *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen, *Nat. Rev. Microbiol.* 14 (2016) 106–117, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6>.
- [3] R. Rajasingham, R.M. Smith, B.J. Park, J.N. Jarvis, N.P. Govender, T.M. Chiller, D. W. Denning, A. Loyse, D.R. Boulware, Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis, *Lancet Infect. Dis.* 17 (2017) 873–881, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8).
- [4] H. Ma, R.C. May, Chapter 5 Virulence in *Cryptococcus* Species, 1st ed., Elsevier Inc., 2009 [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)01005-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)01005-8).
- [5] J.B. Freij, M.S. Fu, C.M. De Leon Rodriguez, A. Dziedzic, A.E. Jedlicka, Q. Dragotakes, D.C.P. Rossi, E.H. Jung, C. Coelho, A. Casadevall, Conservation of intracellular pathogenic strategy among distantly related cryptococcal species, *Infect. Immun.* 86 (2018), <https://doi.org/10.1128/IAI.00946-17>.
- [6] J.H. Diaz, The disease ecology, epidemiology, clinical manifestations, and management of emerging cryptococcosis among distantly related cryptococcal species, *Wilderness Environ. Med.* (2019), <https://doi.org/10.1016/j.wem.2019.10.004>.
- [7] E.R. Ballou, D. Wilson, The roles of zinc and copper sensing in fungal pathogenesis, *Curr. Opin. Microbiol.* 32 (2016) 128–134, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.013>.
- [8] F. Gerwien, V. Skrahina, L. Kasper, B. Hube, S. Brunke, Metals in fungal virulence, *FEMS Microbiol. Rev.* 42 (2018), <https://doi.org/10.1093/femsre/fux050>.
- [9] D. Malavia, A. Crawford, D. Wilson, Nutritional Immunity and Fungal Pathogenesis: The Struggle for Micronutrients at the Host–Pathogen Interface, in: *Adv. Microb. Physiol.*, Academic Press, 2017, pp. 85–103, <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.01.006>.
- [10] F.M. Dos Santos, A.C. Piffer, R.D.O. Schneider, N.S. Ribeiro, A.W.A. Garcia, A. Schrank, L. Kmetzsch, M.H. Vainstein, C.C. Staats, Alterations of zinc homeostasis in response to *Cryptococcus neoformans* in a murine macrophage cell line, *Future Microbiol.* 12 (2017) 491–504, <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0160>.
- [11] K. SubramanianVignesh, J.A. LanderoFiguerola, A. Porollo, J.A. Caruso, G.S. Deepa, Granulocyte macrophage-colony stimulating factor induced Zn sequestration enhances macrophage superoxide and limits intracellular pathogen survival, *Immunity*. 39 (2013) 697–710, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.09.006>.
- [12] D. Wilson, An evolutionary perspective on zinc uptake by human fungal pathogens, *Metallomics* (2015), <https://doi.org/10.1039/c4mt00331d>.
- [13] R.O. de Schneider, N.S.S. de Fogaça, L. Kmetzsch, A. Schrank, M.H. Vainstein, C. C. Staats, Zap1 Regulates Zinc Homeostasis and Modulates Virulence in *Cryptococcus gattii*, *PLoS One* 7 (2012), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043773> e43773.
- [14] R.D.O. Schneider, C. Diehl, F.M. dos Santos, A.C. Piffer, A.W.A. Garcia, M.I. R. Kulmann, A. Schrank, L. Kmetzsch, M.H. Vainstein, C.C. Staats, F. Melise, A. C. Piffer, A. Wichine, A.W.A. Garcia, M. Iuri, R. Kulmann, F.M. dos Santos, A. C. Piffer, A.W.A. Garcia, M.I.R. Kulmann, A. Schrank, L. Kmetzsch, M.H. Vainstein, C.C. Staats, Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence, *Sci. Rep.* 5 (2015) 10104, <https://doi.org/10.1038/srep10104>.
- [15] N.S. Ribeiro, F.M. dos Santos, A.W.A. Garcia, P.A.G.G. Ferrareze, L.F. Fabres, A. Schrank, L. Kmetzsch, M.B. Rott, M.H. Vainstein, C.C. Staats, Modulation of Zinc Homeostasis in *Acanthamoeba castellanii* as a Possible Antifungal Strategy against *Cryptococcus gattii*, *Front. Microbiol.* 8 (2017), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01626>.
- [16] D.J. Eide, Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in saccharomyces cerevisiae, *J. Biol. Chem.* (2009), <https://doi.org/10.1074/jbc.R900014200>.
- [17] C.C. Staats, L. Kmetzsch, A. Schrank, M.H. Vainstein, Fungal zinc metabolism and its connections to virulence, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3 (2013), <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00065>.
- [18] L.S. Joffe, R. Schneider, W. Lopes, R. Azevedo, C.C. Staats, L. Kmetzsch, A. Schrank, M. Del Poeta, M.H. Vainstein, M.L. Rodrigues, The Anti-helminthic Compound Mebendazole Has Multiple Antifungal Effects against *Cryptococcus neoformans*, *Front. Microbiol.* 8 (2017), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00535>.
- [19] M.D. Garcia-Pedrajas, M. Nadal, L.B. Kapa, M.H. Perlin, D.L. Andrews, S.E. Gold, DelsGate, a robust and rapid gene deletion construction method, *Fungal Genet. Biol.* 45 (2008) 379–388, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.11.001>.
- [20] T.D. Schmittgen, K.J. Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 1101–1108, <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
- [21] S. Andrews, *FastQC*, Babraham Bioinforma, 2010 <https://doi.org/citeulike-article-id:11583827>.
- [22] A. Dobin, C.A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, T.R. Gingeras, STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics* (2013), <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>.
- [23] P.A.G. Ferrareze, C. Maufrais, R.S.A. Streit, S.J. Priest, C. Cuomo, J. Heitman, C. C. Staats, G. Janbon, Application of an optimized annotation pipeline to the *Cryptococcus deuterogattii* genome reveals dynamic primary metabolic gene clusters and genomic impact of RNAi loss, *BioRxiv* (2020), <https://doi.org/10.1101/2020.09.01.278374>, 2020.09.01.278374.
- [24] M.I. Love, W. Huber, S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biol.* 15 (2014) 550, <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
- [25] J. Huerta-Cepas, D. Szklarczyk, D. Heller, A. Hernández-Plaza, S.K. Forslund, H. Cook, D.R. Mende, I. Letunic, T. Rattei, L.J. Jensen, C. Von Mering, P. Bork, EggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses, *Nucleic Acids Res.* (2019), <https://doi.org/10.1093/nar/gky1085>.
- [26] J. Huerta-Cepas, K. Forslund, L.P. Coelho, D. Szklarczyk, L.J. Jensen, C. Von Mering, P. Bork, Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper, *Mol. Biol. Evol.* (2017), <https://doi.org/10.1093/molbev/msx148>.
- [27] A. Alexa, J. Rahnenführer, T. Lengauer, Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure, *Bioinformatics*. 22 (2006) 1600–1607, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl140>.
- [28] D.L. Oliveira, F.L. Fonseca, D. Zamith-Miranda, L. Nimrichter, J. Rodrigues, M. D. Pereira, J.C.V. Reuwsaat, A. Schrank, C. Staats, L. Kmetzsch, M.H. Vainstein, M. L. Rodrigues, The putative autophagy regulator Atg7 affects the physiology and pathogenic mechanisms of *Cryptococcus neoformans*, *Future Microbiol.* 11 (2016) 1405–1419, <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0090>.
- [29] P.C. de Souza, A.T. Morey, G.M. Castanheira, K.P. Bocate, L.A. Panagio, F.A. Ito, M. C. Furlaneto, S.F. Yamada-Ogata, I.N. Costa, H.M. Mora-Montes, R.S. Almeida, Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections, *J. Microbiol. Methods* 118 (2015) 182–186, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.004>.
- [30] E.Y. Basenko, J.A. Pulman, A. Shanmugasundram, O.S. Harb, K. Crouch, D. Starns, S. Warrenfeltz, C. Aurrecochea, C.J. Stoeckert, J.C. Kissinger, D.S. Roos, C. Hertz-Fowler, FungiDB: an integrated bioinformatic resource for fungi and oomycetes, *J. Fungi*. 4 (2018) 39, <https://doi.org/10.3390/jof4010039>.
- [31] C. Savojardo, P.L. Martelli, P. Fariselli, G. Profiti, R. Casadio, BUSCA: an integrative web server to predict subcellular localization of proteins, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) W459–W466, <https://doi.org/10.1093/nar/gky320>.
- [32] J. Onodera, Y. Ohsumi, Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 31582–31586, <https://doi.org/10.1074/jbc.M506736200>.
- [33] X. Zhao, W. Feng, X. Zhu, C. Li, X. Ma, X. Li, X. Zhu, D. Wei, Conserved autophagy pathway contributes to stress tolerance and virulence and differentially controls Autophagic flux upon nutrient starvation in *Cryptococcus neoformans*, *Front. Microbiol.* 10 (2019) 1–14, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02690>.
- [34] P.A.G. Ferrareze, R.S.A. Streit, P.R. dos Santos, F.M. dos Santos, R.M.C. de Almeida, A. Schrank, L. Kmetzsch, M.H. Vainstein, C.C. Staats, Transcriptional analysis allows genome reannotation and reveals that *Cryptococcus gattii* VGII undergoes nutrient restriction during infection, *Microorganisms*. 5 (2017) 49, <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030049>.
- [35] S. Vallabhaneni, R.K. Mody, T. Walker, T. Chiller, The global burden of fungal diseases, *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 30 (2016) 1–11, <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.004>.
- [36] R. Falci, F. Queiroz-Telles, A.H. Fahal, D.R. Falci, D.H. Caceres, T. Chiller, A. C. Pasqualotto, Fungal infections 4 neglected endemic mycoses, *Lancet Infect. Dis.* 17 (2017) e367–e377, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30306-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30306-7).
- [37] S. Wilson, A.J. Bird, Zinc sensing and regulation in yeast model systems, *Arch. Biochem. Biophys.* 611 (2016) 30–36, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.02.031>.
- [38] B. Levine, D.J. Klionsky, Review Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy for the degradation of short-lived proteins, autophagy is the primary intracellular catabolic mechanism for degrading and recycling long-lived proteins and o, 2004.
- [39] T. Kawamata, T. Horie, M. Matsunami, M. Sasaki, Y. Ohsumi, Zinc starvation induces autophagy in yeast, *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 8520–8530, <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.762948>.
- [40] A. Bernard, M. Jin, Z. Xu, D.J. Klionsky, A large-scale analysis of autophagy-related gene expression identifies new regulators of autophagy, *Autophagy* (2015), <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1099796>.
- [41] L.-L. Sun, M. Li, F. Suo, X.-M. Liu, E.-Z. Shen, B. Yang, M.-Q. Dong, W.-Z. He, L.-L. Du, Global analysis of fission yeast mating genes reveals new autophagy factors, *PLoS Genet.* 9 (2013), e1003715, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003715>.
- [42] H. Ding, M. Caza, Y. Dong, A.A. Arif, L.C. Horianopoulos, G. Hu, P. Johnson, J. W. Kronstad, ATG genes influence the virulence of *Cryptococcus neoformans* through contributions beyond core autophagy functions, *Infect. Immun.* (2018), <https://doi.org/10.1128/IAI.00069-18>.
- [43] Ane Garcia, Uriel Kinskovski, Camila Diehl, Julia Reuwsaat, Heryk de Souza, Helber Pinto, Danielle Trentin, Haroldo de Oliveira, Marcio Rodrigues, Emilene Becker, Livia Kmetzsch, Marilene Vainstein, Charley Staats, Participation of Zip3, a ZIP domain-containing protein, in stress response and virulence in *Cryptococcus gattii*, *Fungal Genetics and Biology* 144 (2020) 103438, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103438>.



**3.2. Capítulo 2: Connection of a zinc regulated gene and autophagy in *Cryptococcus gattii***

## Connection of a zinc regulated gene and autophagy in *Cryptococcus gattii*

Camila Diehl<sup>a</sup> and Charley C. Staats<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author at: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia. Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Bloco IV, Prédio 43421, Laboratório 219. Caixa Postal 15005. Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil. E-mail address: [staats@ufrgs.br](mailto:staats@ufrgs.br) (C.C. Staats)

## Abstract

*Cryptococcus gattii* is one of the causes of cryptococcosis, a life-threatening disease generally characterized by pneumonia and/or meningitis. In the context of infection, immune cells use the nutritional immunity strategy to eliminate fungal pathogens, creating an unfavorable environment, which may lead to autophagy. This is a biological process that is pivotal for survival in eukaryotic cells under unfavorable conditions. Here, we will proceed with the characterization of the zinc-related gene 1 (*ZRG1*), a possible non-canonical regulator of autophagy in *C. gattii*, employing strains expressing the green fluorescent protein GFP fused with the protein Atg8 (GFP-Atg8) to monitor autophagy. Our initial observations indicate that absence of Zrg1 has an impact on the regulation of autophagy in *C. gattii* under conditions of low nitrogen availability.

In the last decade, the incidence of invasive fungal diseases has increased and is associated with 1.5 million deaths (Centers for Disease Control and Prevention, CDC). One of the most prevalent fungal diseases, cryptococcosis, is generally characterized by meningitis and is mainly caused by two closely related species of encapsulated basidiomycetous yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* (May *et al.*, 2016). Cryptococcal meningitis accounts for over 220,000 individual cases per year, with 180,000 deaths every year (Rajasingham *et al.*, 2017).

Pathogenic cryptococcal species share well-characterized virulence determinants: (i) the presence of a polysaccharide capsule, (ii) the synthesis of a melanin-like pigment, (iii) the capability to proliferate at human body temperature, (iv) the production of host-damaging enzymes, such as urease and phospholipase, and (v) the capability to proliferate inside macrophages (Johnston and May, 2013; Freij *et al.*, 2018). To hamper the infectious process, macrophages and other phagocytes can reduce the availability of nutrients, creating an unfavorable intracellular environment for microbial development (Dos Santos *et al.*, 2017). This strategy is known as nutritional immunity (Malavia, Crawford and Wilson, 2017). To survive in this hostile environment, pathogenic

fungi use strategies to maintain their nutrient uptake, increasing the expression of proteins associated with the uptake of essential metals, such as zinc and iron, and regulation of cellular homeostasis mechanisms (Alanio *et al.*, 2015; Crawford and Wilson, 2015; Urban *et al.*, 2018; Brechting and Rappleye, 2019). In line with the nutritional immunity concept, fungal cells may activate autophagy, a cellular process activated in response to adverse environment conditions. Is a highly conserved cellular mechanism in eukaryotic cells, regulated by autophagy-related genes (*ATG*) (Onodera and Ohsumi, 2005b; Cebollero and Reggiori, 2009; Kawamata *et al.*, 2017). In *Cryptococcus* species, nutrient acquisition and proper regulation of the autophagic process are necessary for properly producing virulence determinants and for infecting hosts (R. D. O. Schneider *et al.*, 2015; Ding *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019a).

In a recently publication from our group (Diehl *et al.*, 2021), we highlighted the importance of zinc-related gene 1 (*ZRG1*) in zinc homeostasis, growth in nutrient deprivation conditions, and virulence of *C. gattii*. The *ZRG1* null mutants demonstrated impaired growth in zinc- and nitrogen-limiting conditions and upregulation of autophagy-like phenotypes. Notably, cryptococcal cells lacking *Zrg1* displayed decreased capability to survival inside macrophages and attenuated virulence in an invertebrate model (Diehl *et al.*, 2021). These observations reinforce the assumption that distinct species have evolved specific mechanisms for addressing nutrient-restricted environments, employing autophagic processes to survive and recycle resources in these conditions.

Notably, cryptococcal cells lacking *Zrg1* are not able to grow under nitrogen starvation conditions, something that has been observed in different fungal species lacking key regulators of the autophagic pathway (Palmer, Kelly and Sturtevant, 2007; Hu *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019a). However, these null mutants showed an increase accumulation of autophagic bodies under autophagy inducing conditions (Diehl *et al.*, 2021). In contrast, *C. neoformans* lacking *Atg7* is not able to accumulate these autophagic bodies (Oliveira *et al.*, 2016). These results suggest that *Zrg1* does not play a role as a regulator in the initial stages of autophagy activation in *C. gattii*, but may play a role as a non-canonical regulator for autophagy. Based on the main highlights

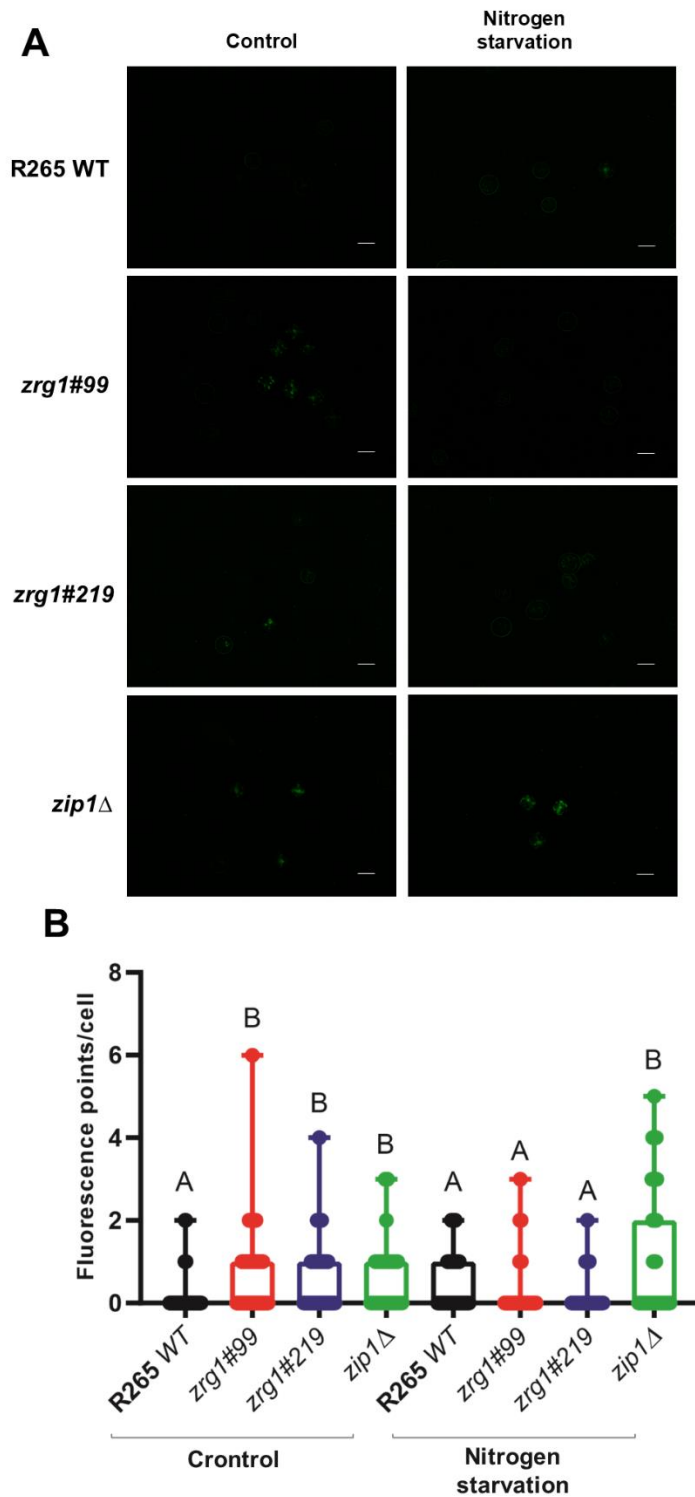
about Zrg1, we decided to further proceed with the characterization of this protein in the autophagic process.

## Results and discussion

To monitor autophagy, we generated Atg8 protein fusion with GFP fluorescent protein (GFP-Atg8) ('Assays to Monitor Autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*', 2017) in R265 wild type cells, two Zrg1 null mutants (*zrg1#99* and *zrg1#219*) (Diehl *et al.*, 2021) and a mutant lacking the main zinc transporter Zip1 (*zip1* $\Delta$ ) (R. D. O. Schneider *et al.*, 2015). In *S. cerevisiae* cells, zinc depletion is a trigger of non-selective autophagy, an important phenotype necessary for yeast growth in zinc-limited conditions. This leads to the degradation of some zinc-binding proteins, allowing the zinc pools to be directed to essential proteins (Kawamata *et al.*, 2017). Therefore, we decided to evaluate the regulation of the autophagic pathway in a *C. gattii* mutant that has defects in zinc uptake. Fluorescent labeling of the Atg8 protein is the main technique to monitor autophagy in fungal cells (Delorme-Axford *et al.*, 2015; Torggler, Papinski and Kraft, 2017). It was possible to observe the presence of green fluorescence in the GFP-Atg8 transformants. This fluorescence is dispersed throughout the cytoplasm, an expression pattern and localization expected for growth conditions without induction of autophagy (Fig. S1). Also, we confirmed the insertion of the fragment derived from the vector construct into genome of the strains by PCR, confirming the generation of GFP-Atg8 mutants (Fig. S1).

We previously hypothesized that Zrg1 may act as a regulatory molecule in *C. gattii*, which seems to have an essential role in the activation of homeostasis mechanisms in the fungal cell in response to nutrient deprivation (Diehl *et al.*, 2021). We used the GFP-Atg8 strains to assess autophagy during both nitrogen and zinc starvation conditions (Fig. 1A and 1B; Fig. S2). Under the control condition (YNB-Asn medium), we observed higher number of GFP-Atg8 puncta in all mutant cells compared to WT, confirming that lack of Zrg1 affects the autophagic control in cryptococcal cells. In contrast, under nitrogen starvation (YNB medium), we could not observe differences in the abundance of GFP-Atg8 puncta when comparing WT and *zrg1* mutants, contrary to *zip1* mutants, in which

the autophagic marker is also higher (Fig. 1, A). Finally, the depletion of zinc caused by the intracellular chelator TPEN caused a mild alteration. Only the null mutants of *ZIP1* displayed a increased number of GFP-Atg8 puncta when comparing to the WT under the same condition (Fig. S2). Taken together, these results suggests that Zrg1 may act as a negative regulator of autophagy and that zinc absence may also induces this process. It is interesting to observe the



**Figure 1: Fluorescence of GFP-Atg8 upon nitrogen starvation. (A)** *C. gattii* R265 WT, *zrg1#99*, *zrg1#219* and *zip1* $\Delta$  cells after shifting to YNB-Asn or YNB medium containing 1 mM PMSF for 3 h were observed by fluorescence microscopy. Scale bars = 5  $\mu$ M. **(B)** Counting of GFP-Atg8-related fluorescence points under control and nitrogen starvation conditions. The results are presented as a dispersion of the number of points per cell evaluated. Statistical analyzes were performed using the Kruskal-Wallis test.

reduction of autophagy induction in *zrg1* null mutants in the nitrogen-deprived environment. This result indicates that the lacking of Zrg1 impacts the ability of *C. gattii* cells to adapt in environments with low availability of nutrient sources.

We have already described that Zrg1 is associated with growth regulation of *C. gattii* under starvation conditions, suggesting its role as a non-canonical regulator of autophagy. In fact, autophagy has a highly conserved regulatory mechanism in eukaryotes, but recent studies show there are particularities in autophagy between species, revealing the existence of different activating and repressor proteins of the pathway (Sun *et al.*, 2013; Bernard *et al.*, 2015). This may be the case for Zrg1 in *C. gattii*.

## Materials and methods

### *Strains and culture conditions*

The *C. gattii* R265 WT, *zrg1#99*, *zrg1#219* and *zip1* $\Delta$  null mutant strains were used in this work. These strains were routinely cultured in YPD medium at 30 °C on constant rotation platform (200 rpm). For microscopy evaluations, the culture was performed in YNB medium with/without the addition of asparagine (Asn) for the control and nitrogen starvation conditions. To induce the zinc starvation condition, we used the addition of 10  $\mu$ M TPEN to the culture.

### *Construct GFP-Atg8 expression strains*

To construct the GFP-Atg8 fusion protein expression plasmid, the *ATG8* open reading frame (ORF) were amplified from the genome of *C. gattii* and GFP were amplified from the pCN19 (Price, Nichols and Alspaugh, 2008). The products were assembled by Double-joint PCR, and the resultant fragment was inserted into the EcoRV site in pJAF1 by In-Fusion HD Cloning to generate final plasmid pJAF1-G418-GFP-Atg8 (Fig. S3). The final plasmid was transformed into

the R265 WT, *zrg1#99*, *zrg1#219* and *zip1*Δ strains by biolistic. The fusion of GFP with the Atg8 protein was performed from the N-terminally of the protein. Primers used are listed in Table S1.

### *Fluorescence microscopy analysis*

Yeast cells expressing GFP-Atg8 were observed by both fluorescence microscopy using Axioscope Microscopy (Zeiss, Germany). Image analysis, quantification of total fluorescence and count of fluorescence spots were performed using ImageJ software (NIH, US).

### **Acknowledgments**

This work was supported by grants from the Brazilian agency Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (404141/2016–1 and 309897/2017–3). We acknowledge support from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **Author contributions**

Camila Diehl: Conceptualization, methodology, formal analysis, writing - Original Draft.

Charley C. Staats: Conceptualization, formal analysis, resources, writing - Review & Editing, visualization, supervision, funding acquisition.

### **References**

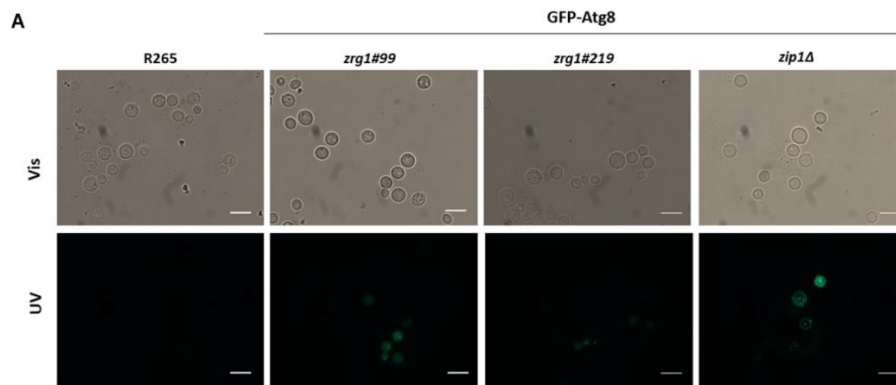
1. May, R. C., Stone, N. R. H., Wiesner, D. L., Bicanic, T. & Nielsen, K. *Cryptococcus*: From environmental saprophyte to global pathogen. *Nature Reviews Microbiology* vol. 14 106–117 (2016).
2. Rajasingham, R. *et al.* Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect. Dis.* **17**, 873–881 (2017).
3. Freij, J. B. *et al.* Conservation of Intracellular Pathogenic Strategy among Distantly Related Cryptococcal Species. *Infect. Immun.* **86**, (2018).



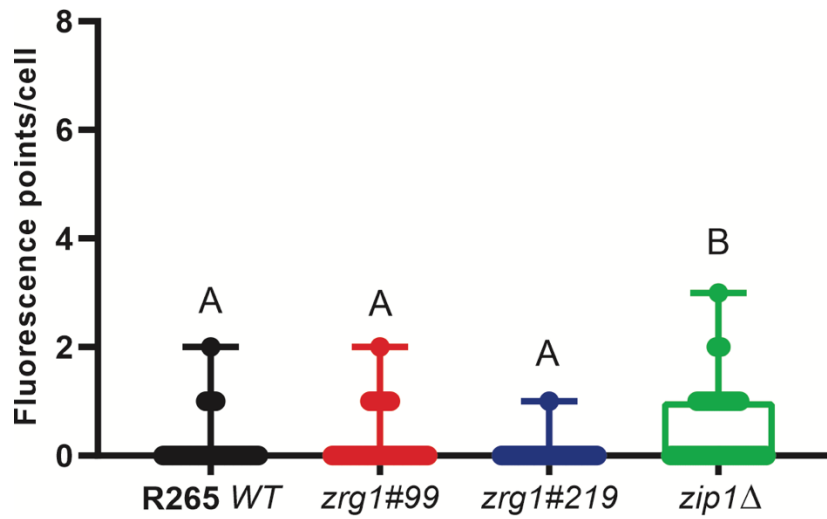
4. Johnston, S. A. & May, R. C. Microreview *Cryptococcus* interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. **15**, 403–411 (2013).
5. Dos Santos, F. M. *et al.* Alterations of zinc homeostasis in response to *Cryptococcus neoformans* in a murine macrophage cell line. *Future Microbiol.* **12**, 491–504 (2017).
6. Malavia, D., Crawford, A. & Wilson, D. Nutritional Immunity and Fungal Pathogenesis: The Struggle for Micronutrients at the Host–Pathogen Interface. in *Advances in Microbial Physiology* vol. 70 85–103 (Academic Press, 2017).
7. Alanio, A., Vernel-Pauillac, F., Sturny-Leclère, A. & Dromer, F. *Cryptococcus neoformans* host adaptation: Toward biological evidence of dormancy. *MBio* **6**, (2015).
8. Brechting, P. J. & Rappleye, C. A. *Histoplasma* Responses to Nutritional Immunity Imposed by Macrophage Activation. *J. Fungi* **5**, 45 (2019).
9. Crawford, A. & Wilson, D. Essential metals at the host-pathogen interface: Nutritional immunity and micronutrient assimilation by human fungal pathogens. *FEMS Yeast Research* vol. 15 71 (2015).
10. Urban, C. F. *et al.* Biphasic zinc compartmentalisation in a human fungal pathogen. *PLOS Pathog.* **14**, e1007013 (2018).
11. Cebollero, E. & Reggiori, F. Regulation of autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* vol. 1793 1413–1421 (2009).
12. Kawamata, T., Horie, T., Matsunami, M., Sasaki, M. & Ohsumi, Y. Zinc starvation induces autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* **292**, 8520–8530 (2017).
13. Onodera, J. & Ohsumi, Y. Autophagy Is Required for Maintenance of Amino Acid Levels and Protein Synthesis under Nitrogen Starvation. *J. Biol. Chem.* **280**, 31582–31586 (2005).
14. Ding, H. *et al.* ATG genes influence the virulence of *Cryptococcus neoformans* through contributions beyond core autophagy functions. *Infect. Immun.* **86**, 1–24 (2018).
15. Schneider, R. D. O. *et al.* Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. *Sci. Rep.* **5**, 10104 (2015).
16. Zhao, X. *et al.* Conserved Autophagy Pathway Contributes to Stress Tolerance and Virulence and Differentially Controls Autophagic Flux Upon Nutrient Starvation in *Cryptococcus neoformans*. *Front. Microbiol.* **10**,

- (2019).
17. Diehl, C. *et al.* Zrg1, a cryptococcal protein associated with regulation of growth in nutrient deprivation conditions. *Genomics* **113**, 805–814 (2021).
  18. Hu, G. *et al.* PI3K signaling of autophagy is required for starvation tolerance and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Invest.* **118**, 1186–1197 (2008).
  19. Palmer, G. E., Kelly, M. N. & Sturtevant, J. E. Autophagy in the pathogen *Candida albicans*. *Microbiology* **153**, 51–58 (2007).
  20. Oliveira, D. L. *et al.* The putative autophagy regulator Atg7 affects the physiology and pathogenic mechanisms of *Cryptococcus neoformans*. *Future Microbiol.* **11**, 1405–1419 (2016).
  21. Assays to Monitor Autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cells* **6**, 23 (2017).
  22. Delorme-Axford, E., Guimaraes, R. S., Reggiori, F. & Klionsky, D. J. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: An overview of methods to study autophagy progression. *Methods* **75**, 3–12 (2015).
  23. Torggler, R., Papinski, D. & Kraft, C. Assays to Monitor Autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cells* **6**, 23 (2017).
  24. Bernard, A., Jin, M., Xu, Z. & Klionsky, D. J. A large-scale analysis of autophagy-related gene expression identifies new regulators of autophagy. *Autophagy* **11**, 2114–2122 (2015).
  25. Sun, L. L. *et al.* Global Analysis of Fission Yeast Mating Genes Reveals New Autophagy Factors. *PLoS Genet.* **9**, (2013).
  26. Price, M. S., Nichols, C. B. & Alspaugh, J. A. The *Cryptococcus neoformans* Rho-GDP Dissociation Inhibitor Mediates Intracellular Survival and Virulence. *Infect. Immun.* **76**, 5729 (2008).

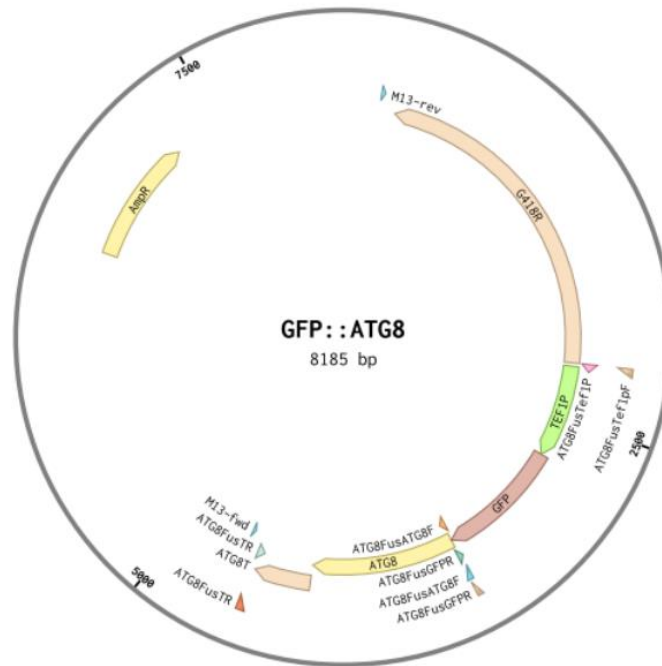
## Supplementary material



**Supplementary Figure 1: Localization of GFP-Atg8.** (A) Control R265 and *zrg1#99*, *zrg1#219* and *zip1Δ* transformants cells were observed by both fluorescence microscopy with Axioscope microscope. Scale bars = 5  $\mu$ M.



**Supplementary Figure 2: Fluorescence of GFP-Atg8 upon zinc starvation.** Counting of GFP-Atg8-related fluorescence points under control and nitrogen starvation conditions. The results are presented as a dispersion of the number of points per cell evaluated. Statistical analyzes were performed using the Kruskal-Wallis test.



**Supplementary Figure 3: Physical map of plasmid pJAF1-G418-GFP-Atg8.**

**Supplementary Table 1: List of primers used in this work**

| <b>Primer name</b>  | <b>Sequence 5' – 3'</b>                    |
|---------------------|--|
| <b>ATG8FusTef1P</b> | CAAGGGCGAATTCTGCAGATGGCAGATACGATATGTTGGCGC |
| <b>ATG8FusGFPR</b>  | TTCGGACCATGTACAGCTCGTCCATGCCG              |
| <b>ATG8FusATG8F</b> | CGAGCTGTACATGGTCCGAAGCAAGTTTAAGG           |
| <b>ATG8FusTR</b>    | CGGCCGCCAGTGTGATGGATAAATCTGAAATGGGTGGCATCC |

## 4. Discussão geral

O adequado metabolismo de nutrientes é um requisito essencial para o desenvolvimento de organismos, por isso a homeostase de fontes de nitrogênio, carbono e metais, como o zinco, manganês e ferro, são finamente reguladas pela célula (Ene *et al.*, 2014; Ballou and Wilson, 2016). *C. gattii* desenvolveu importantes mecanismos para a manutenção dos níveis de nutrientes necessários para o seu desenvolvimento, alterando perfis de expressão gênica e assim, possibilitando o desenvolvimento da célula fúngica em nichos distintos. Um exemplo dessa adaptação, é a regulação da homeostase de zinco. Zinco é um importante cofator para inúmeras proteínas e tem sua homeostase regulada por uma série de genes bem caracterizados em células eucarióticas (Lulloff, Hahn and Sohnle, 2004).

Variações na disponibilidade de nutrientes ocasionam mudanças rápidas no perfil de expressão gênica de fungos patogênicos, possibilitando a adaptação da maquinaria para captação e utilização de fontes distintas de nutrientes (Eide, 2009; Wilson and Amanda J Bird, 2016; Ries *et al.*, 2018). Por exemplo, fungos utilizam preferencialmente glicose como fonte principal de carbono e a utilização dessa fonte de carbono é regulada por um sistema que permite o metabolismo preferencial de glicose e açúcares antes de outras fontes de carbono disponíveis. Esse sistema utiliza reguladores transcricionais para ajustar a repressão de genes responsáveis por codificar enzimas para o catabolismo de fontes de carbono alternativas. Fungos patogênicos, como *C. neoformans*, *C. albicans* e *A. fumigatus*, encontram diferentes condições de disponibilidade de carbono durante um contexto de infecção. Dependendo do nicho infeccioso em que se encontram, essas leveduras precisam se adaptar a variações na concentração de glicose e disponibilidade de fontes alternativas de carbono. Por isso, alterações no perfil transcricional são tão essenciais para sobrevivência dessas células. Nos últimos anos, alguns trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa evidenciaram a importância do apropriado metabolismo de zinco e

outros metais, como manganês, no desenvolvimento e virulência de *Cryptococcus spp* (Schneider *et al.*, 2012, 2015; Garcia *et al.*, 2020).

Decidimos prosseguir com a descrição de genes envolvidos na homeostase de micronutrientes em *C. gattii*. No capítulo 1 dessa tese, nós apresentamos a caracterização de Zrg1. A partir de um *screening* em uma biblioteca de mutantes de inserção de T-DNA de *C. gattii* para identificar novos genes envolvidos no metabolismo do zinco, identificamos um mutante que apresentou hipersensibilidade aos agentes quelantes de metais DTPA e TPEN. O gene interrompido nessa cepa, que denominamos *Zinc-Related Gene 1* (*ZRG1*), codifica um produto que não apresentou nenhum domínio conservado descrito, o que não nos permitiu inferir os mecanismos relacionados à homeostase de zinco com base na similaridade de sequências. Por esse motivo, utilizamos abordagens genéticas para caracterizar o papel de Zrg1 na célula fúngica. Inicialmente, avaliamos a expressão de *ZRG1* em *C. gattii* na condição de disponibilidade e de privação de zinco, que para todas as análises apresentadas, foi obtida a partir da adição de 10 µM de TPEN ao meio de cultivo. Observamos um aumento nos níveis de transcritos na condição de privação de zinco em relação a condição controle, o que nos serviu como uma evidência inicial de que esse gene tem sua expressão regulada pela disponibilidade do metal, direta ou indiretamente. Geramos duas linhagens mutantes nulos para *ZRG1* (*zrg1#99* e *zrg1#219*). Como esperado, observamos diferenças significativas no desenvolvimento das linhagens mutantes quando as células são submetidas a condição de privação de zinco, mantendo o fenótipo observado anteriormente. Quando avaliamos os níveis de expressão de *ZIP1* e *ZAP1*, observamos uma redução na ativação desses genes pela indução da condição de privação de zinco nas células mutantes para Zrg1, sugerindo que Zrg1 tem um papel na regulação da homeostase de zinco.

Por meio da análise do transcriptoma de células mutantes para *ZRG1*, descrevemos um conjunto de genes regulados por essa molécula. Zrg1 regula um conjunto bastante robusto de genes em *C. gattii* em ambas as condições avaliadas: 1105 genes são diferencialmente expressos na condição controle (meio YNB-Asn); 1272 genes são diferencialmente expressos na condição de privação de zinco (meio YNB-Asn + TPEN). Interessante notar que existe um



conjunto bastante expressivo de genes *down* regulados quando as células mutantes para Zrg1 são submetidas a condição de privação de zinco, mostrando que a ausência dessa molécula tem impacto no perfil de expressão das células de *C. gattii* em resposta a essa condição. Curiosamente, nós encontramos um número considerável de genes diferencialmente expressos (*up* e *down* regulados) nas células mutantes para Zrg1 na condição controle. Como comentado anteriormente, as células mutantes não apresentam alterações fenotípicas expressivas em condições normais de desenvolvimento, portanto esse conjunto robusto de genes regulados por Zrg1 nessa condição é um achado muito interessante.

O perfil funcional dos genes regulados foi realizado utilizando a análise de enriquecimento por *Gene Ontology* (GO). Com o conjunto de genes regulados positivamente, encontramos uma redução do enriquecimento de genes relacionados a funções associadas à expressão e tradução gênicas propriamente ditas. Descobrimos uma redução do enriquecimento de genes relacionados a biossíntese e metabolismo de peptídeos e aminoácidos, metabolismo de nitrogênio e funções associadas a estruturação e montagem de ribossomos, evidenciando que, de uma forma geral, a ausência de Zrg1 influencia em processos essenciais para a manutenção da síntese proteica nas células de *C. gattii*. Importante observar que existe uma sobreposição das funções enriquecidas tanto para a condição controle quanto para a condição de privação de zinco, deixando claro que a ausência de Zrg1 por si só afeta esses processos celulares. Entretanto, a avaliação dos genes regulados negativamente para as duas condições nos mostrou um enriquecimento de funções celulares distintas, como replicação de DNA e processos relacionados ao metabolismo de carboidratos. Nossos achados trouxeram luz ao fato de que a ausência de Zrg1 afeta funções metabólicas importantes para as células de *C. gattii*, independente da disponibilidade de zinco.

Como apresentado anteriormente, a autofagia é o principal processo para manutenção da síntese proteica em células eucarióticas (Onodera and Ohsumi, 2005). Com base nos nossos achados a partir da análise do transcriptoma, hipotetizamos que Zrg1 poderia estar envolvido na regulação da via autofágica em *C. gattii*. Analisando a expressão dos genes *ATG* nos dados do RNA-seq,

descobrimos diferenças de expressão significativas em ambas as condições avaliadas. *ATG1*, *ATG2*, *ATG9*, *ATG11* e *ATG13* encontram-se mais expressos no mutante nulo para *Zrg1* em relação a linhagem selvagem na condição controle (meio YNB-Asn). Da mesma forma, *ATG1*, *ATG2*, *ATG11* e *ATG15* estão mais expressos na condição de privação de zinco (YNB-Asn + TPEN). Interessante notar que o complexo formado entre *Atg1-Atg13* desempenha um papel fundamental na ativação da via autofágica. *Atg9* por sua vez, participa ativamente da formação do autofagossomo e interage com o complexo *Atg2-Atg18* e com o complexo de PI3K. *Atg15*, que foi diferencialmente expressa apenas na condição de privação, codifica uma lipase putativa que participa da degradação de corpos autofágicos (Xie and Klionsky, 2007; Zhao *et al.*, 2019a).

Partimos para a avaliação da autofagia através da análise do acúmulo de corpos autofágicos. Como discutido anteriormente, a privação de nitrogênio é a principal sinalização para a ativação da autofagia em células eucarióticas. Utilizando a condição de privação de nitrogênio (meio YNB) e inibidores de protease, nós conseguimos visualizar que os mutantes nulos acumulam uma quantidade maior de corpos autofágicos em condições de privação de nitrogênio. Juntos, esses resultados evidenciam que *Zrg1* potencialmente participa, de alguma forma, da regulação da autofagia. Utilizamos uma linhagem mutante para *ATG7* de *C. neoformans* durante essas análises, a fim de comparar os fenótipos relacionados a autofagia. O mutante nulo para *Atg7* apresenta severas deficiências na via autofágica, sendo incapaz de produzir corpos autofágicos em condições de indução (Oliveira *et al.*, 2016).

Sabemos que a deleção de *ATG7* leva as células *C. neoformans* apresentarem diminuição na capacidade de desenvolvimento em condições de privação de nitrogênio e, por sua vez, esse é um fenótipo também observado em outras espécies fúngicas (Oliveira *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019b). Nós avaliamos o desenvolvimento dos mutantes de *Zrg1* nessa condição. A ausência de *Zrg1* tem impacto na capacidade das células de *C. gattii* em se desenvolverem em condições de privação de nitrogênio. É bastante curioso notar que a perda da capacidade de se desenvolver de maneira adequada em ambientes de privação, tanto de nitrogênio quanto de zinco, nos mutantes para *Zrg1* não está relacionada diretamente com a perda da ativação

da via autofágica ou a incapacidade de formação de autofagossomos e corpos autofágicos, pois, aparentemente, esses mecanismos continuam ativos nas células.

Avaliamos a influência da deleção de Zrg1 na virulência de *C. gattii*. Como esperado, os mutantes apresentaram menores taxas de proliferação intracelular e atenuação da virulência em modelos invertebrados de infecção. Durante a interação com células de macrófagos *in vitro*, não encontramos diferenças nas taxas de fagocitose, mas a análise de IPR revelou que a diminuição da capacidade de desenvolvimento de células mutantes para Zrg1 em ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes levou *C. gattii* a apresentar menor índice de sobrevivência e proliferação intrafagossômica. Apesar de não encontrarmos alterações fenotípicas em determinantes de virulência nessas células, Zrg1 impacta diretamente em um mecanismo clássico utilizado por *Cryptococcus* para garantir a infecção em seus hospedeiros.

É importante comentar, para fins de registro, que a sequência gênica de Zrg1 no genoma de *C. gattii* possui um tamanho bastante robusto, cerca de 6000 pb, e a proteína predita codificada por esse gene tem uma massa molecular de cerca de 122 kDa. O tamanho dessas sequências dificultou algumas abordagens genéticas utilizadas. Nós não conseguimos realizar a complementação do gene *ZRG1* no genoma de *C. gattii*, tanto em *locus* de inserção aleatória quanto no *locus* específico. Realizamos a tentativa de superexpressão desse gene, com o objetivo de obter maiores níveis da proteína Zrg1, que pudessem posteriormente permitir a fusão de Zrg1 com uma *tag*. Também tentamos realizar a fusão da proteína com a proteína fluorescente *mCherry* e a expressão recombinante de Zrg1 em *E. coli*, tanto da estrutura proteica total, quanto de três diferentes porções da proteína. Essas abordagens facilitaríamos a análise e confirmação de possíveis proteínas interatoras presentes no proteoma de *C. gattii*, assim como permitiriam identificar a localização de Zrg1 na célula, mas em nenhum dos casos obtivemos sucesso.

A partir de todos esses achados, nós finalizamos esse trabalho sugerindo que Zrg1 é, potencialmente, um regulador não-canônico da autofagia em *C. gattii*. Essa proteína tem um papel essencial no desenvolvimento da levedura em ambientes adversos, como ambientes de baixa disponibilidade de zinco e

nitrogênio e participa de forma robusta na regulação de processos metabólicos importantes para o desenvolvimento de *C. gattii*. Decidimos prosseguir com a caracterização de Zrg1, com foco no seu envolvimento no processo de autofagia em *C. gattii*.

O capítulo 2 dessa tese está apresentado na forma de um *Hypothesis* e traz algumas observações iniciais sobre o envolvimento de Zrg1 na regulação da autofagia. Nós geramos linhagens onde a proteína Atg8 foi fusionada com a proteína verde fluorescente (GFP). Atg8 é processada na região C-terminal pela protease Atg4 para expor um resíduo de glicina. A partir desse resíduo, a proteína é conjugada com o lipídeo fosfatidiletanolamina (PE), formando o complexo Atg8-PE, que se associa em ambas as faces da membrana do autofagossomo durante o ciclo de formação dessa estrutura. Enquanto é removido da membrana externa pela ação de Atg4 durante o processo de maturação, permanece associado a membrana interna do autofagossomo. Dessa forma, Atg8 é entregue ao vacúolo com o corpo autofágico na etapa de fusão, sendo posteriormente degradado ao final do processo (Kawamata *et al.*, 2008; Delorme-Axford *et al.*, 2015). Portanto, nós marcamos Atg8 a partir da fusão no N-terminal com GFP no *locus* genômico de *ATG8* em *C. gattii*, gerando mutantes GFP-Atg8 nas linhagens R265 *WT*, *zrg1#99*, *zrg1#219* e *zip1Δ*.

Inicialmente, optamos por realizar o monitoramento da autofagia por microscopia de fluorescência. É importante destacar que a visualização dessa fluorescência requer a entrega de quantidades robustas de GFP-Atg8 ao vacúolo, pois o sinal de GFP é parcialmente extinto em ambientes ácidos. Nós avaliamos o fluxo autofágico em três condições: controle (meio YNB-Asn), privação de nitrogênio (meio YNB *wo* Asn) e privação de zinco (meio YNB-Asn *add* TPEN), a fim de avaliar a influência da sinalização imposta em ambientes de baixa disponibilidade desses nutrientes essenciais na resposta autofágica das células. Como comentado anteriormente, a privação de zinco gera respostas autofágicas aberrantes em linhagens de *S. cerevisiae* mutantes para *ATG2* e *ATG11*, levando as células a apresentarem diminuição da sua viabilidade e replicação (Kawamata *et al.*, 2017). Nós encontramos maiores níveis de fluorescência relacionada a GFP-Atg8 nos mutantes de Zrg1, em comparação com *WT*, após 3 horas de cultivo na condição controle. Utilizamos a contagem

de pontos de acúmulo de fluorescência nas células para determinar a regulação de ativação da via autofágica. É importante destacar que nós utilizamos inibidores de proteases durante esses experimentos, para impedir a ação de parte das proteases vacuolares e permitir a visualização do acúmulo de fluorescência.

De uma forma bastante inicial, esse resultado sugere que os mutantes de Zrg1 possuem uma regulação positiva da autofagia em condições de disponibilidade de nutrientes. De fato, esse resultado condiz com as observações obtidas durante a análise dos dados de RNA-seq, onde nós encontramos genes *ATG*, importantes para a regulação do início do processo autofágico, positivamente regulados nessa condição. No entanto, quando nós avaliamos os níveis de fluorescência das células cultivadas na condição de privação de nitrogênio, curiosamente, encontramos a redução dos pontos de acúmulo de GFP nos mutantes de Zrg1, em comparação com seus pares na condição controle. Isso sugere que, de alguma forma, a ausência de Zrg1 interfere no ciclo autofágico quando as células são submetidas a condições adversas de desenvolvimento.

Como discutido anteriormente, a regulação da via autofágica é um processo extremamente conservado em eucariotos, controlado majoritariamente por proteínas Atg, hierárquicas dentro da via. Porém, estudos mostram a presença de interações entre proteínas Atg e proteínas acessórias para o fluxo correto do processo autofágico. Em *S. cerevisiae*, análises em uma biblioteca de mutantes de proteínas de ligação de DNA levou a identificação de moléculas que atuam como reguladores positivos da transcrição de genes *ATG*, assim como foram identificadas duas proteínas que atuam como repressores da transcrição de genes *ATG* na levedura (Bernard *et al.*, 2015). Apesar da semelhança da maquinaria autofágica de *S. cerevisiae* em vários eucariotos, particularidades nos mecanismos de autofagia entre as diferentes espécies refletem a existência de genes adicionais relacionados à autofagia (Sun *et al.*, 2013).

Sabemos que Zrg1, não necessariamente, atua como regulador transcricional de genes *ATG* em *C. gattii*, visto que não identificamos domínios de ligação ao DNA presentes na proteína. No entanto, acreditamos que a proteína possa atuar na sinalização de resposta ao estresse imposta pela

privação de nutrientes, levando a célula a um desbalanço metabólico e incapacidade de responder com a adaptação de sua maquinaria em ambientes adversos. De fato, algumas análises de indução de estresse sequencial nos mutantes de Zrg1, utilizando a indução de estresse por privação de zinco e posteriormente um estresse de geração de espécies reativas de oxigênio, mostraram uma dificuldade desses mutantes em manter sua viabilidade (dados não mostrados). É interessante notar que *zip1*Δ GFP-Atg8 apresentou altos níveis de fluorescência durante esse ensaio, tanto na condição controle quanto na condição de privação de nitrogênio, indicando que a deficiência no metabolismo de zinco, possivelmente, levou essas células a apresentarem uma regulação aberrante da autofagia. Os níveis de fluorescência para *zip1*Δ são na verdade comparáveis aos níveis de fluorescência dos mutantes de Zrg1 na condição controle, indicando uma relação entre Zrg1 e o metabolismo de zinco, como sugerido no início desse estudo.

De fato, nós ainda não podemos afirmar que os pontos de fluorescência observados são referentes a entrega de GFP-Atg8 associada aos corpos autofágicos para o vacúolo. Ainda precisamos realizar uma análise mais detalhada do ciclo autofágico nessas células.

## 5. Conclusões

O presente trabalho demonstrou a função de Zrg1 na regulação do desenvolvimento de *C. gattii* durante condições de privação de nutrientes, através da análise do transcriptoma de células mutantes para o gene *ZRG1* e a avaliação de sobrevivência e viabilidade da levedura. Nossos dados apontam as seguintes conclusões:

- I. Zrg1 regula um conjunto robusto de genes em *C. gattii* que participam de processos metabólicos essenciais na célula da levedura;
- II. Zrg1 influencia a capacidade de desenvolvimento de *C. gattii* em condições de privação de nutrientes, como zinco e nitrogênio;
- III. A ausência de Zrg1 impacta na regulação da autofagia em *C. gattii*, levando as células a apresentarem fenótipos autofágicos anormais em condições de indução de autofagia;
- IV. A deficiência de desenvolvimento apresentada pelas células mutantes para Zrg1 impacta diretamente na virulência de *C. gattii* em modelos invertebrados de infecção.

## 6. Perspectivas

- Visualizar o ciclo autofágico nas linhagens GFP-Atg8 utilizando microscopia de fluorescência *time-lapse*;
- Quantificar os níveis de GFP-Atg8 e GFP livre por *western blott*, para avaliar a entrega dos corpos autofágicos para o vacúolo das linhagens;
- Microscopia de fluorescência utilizando um marcador de vacúolo a fim de localizar os sinais de acúmulo de GFP nas células;
- Avaliação do fluxo autofágico durante a interação patógeno-hospedeiro, utilizando linhagens de macrófagos murinos a fim de visualizar diferenças na ativação e manutenção da autofagia nas linhagens mutantes para Zrg1.



## 7. Referências bibliográficas

Akins, P. T. and Jian, B. (2019) 'The Frozen Brain State of *Cryptococcus gattii*: A Globe-Trotting, Tropical, Neurotropic Fungus', *Neurocritical care*, 30(2), pp. 272–279. doi: 10.1007/S12028-018-0538-4.

Alvarez, M. and Casadevall, A. (2006) 'Phagosome Extrusion and Host-Cell Survival after *Cryptococcus neoformans* Phagocytosis by Macrophages', *Current Biology*, 16(21), pp. 2161–2165. doi: 10.1016/j.cub.2006.09.061.

Aminnejad, M. *et al.* (2012) 'Identification of Novel Hybrids Between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII', *Mycopathologia*, 173(5–6), pp. 337–346. doi: 10.1007/S11046-011-9491-X/TABLES/2.

Angkasekwinai, P. *et al.* (2014) '*Cryptococcus gattii* Infection Dampens Th1 and Th17 Responses by Attenuating Dendritic Cell Function and Pulmonary Chemokine Expression in the Immunocompetent Hosts'. doi: 10.1128/IAI.01773-14.

Atri, C., Guerfali, F. Z. and Laouini, D. (2018) 'Molecular Sciences Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases'. doi: 10.3390/ijms19061801.

Bain, J. M. *et al.* (2012) 'Non-lytic expulsion/exocytosis of *Candida albicans* from macrophages', *Fungal Genetics and Biology*, 49(9), pp. 677–678. doi: 10.1016/j.fgb.2012.01.008.

Ballou, E. R. and Wilson, D. (2016) 'The roles of zinc and copper sensing in fungal pathogenesis', *Current Opinion in Microbiology*, 32, pp. 128–134. doi: 10.1016/j.mib.2016.05.013.

Bernard, A. *et al.* (2015) 'A large-scale analysis of autophagy-related gene expression identifies new regulators of autophagy', *Autophagy*, 11(11), pp. 2114–2122. doi: 10.1080/15548627.2015.1099796.

Bielska, E. *et al.* (2018) 'Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*', *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41467-018-03991-6.

Bielska, E. and May, R. C. (2015) 'What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen?', *FEMS Yeast Research*. Oxford University Press. doi: 10.1093/femsyr/fov106.

Bird, A. J. *et al.* (2006) 'Repression of ADH1 and ADH3 during zinc deficiency by Zap1-induced intergenic RNA transcripts', *The EMBO Journal*, 25(24), p. 5726. doi: 10.1038/SJ.EMBOJ.7601453.

Bongomin, F. *et al.* (2017) 'Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision', *Journal of Fungi*, 3(4), p. 57. doi: 10.3390/jof3040057.

Camacho, E. *et al.* (2019) 'The structural unit of melanin in the cell wall of

the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*', *Journal of Biological Chemistry*, (1), p. jbc.RA119.008684. doi: 10.1074/jbc.RA119.008684.

Casadevall, A. *et al.* (2019) 'The "Amoeboid Predator-Fungal Animal Virulence" Hypothesis', *Journal of Fungi*, 5(1), p. 10. doi: 10.3390/jof5010010.

Cebollero, E. and Reggiori, F. (2009) 'Regulation of autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, pp. 1413–1421. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.01.008.

Chaturvedi, V. and Chaturvedi, S. (2011a) '*Cryptococcus gattii*: A resurgent fungal pathogen', *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 564–571. doi: 10.1016/j.tim.2011.07.010.

Chaturvedi, V. and Chaturvedi, S. (2011b) '*Cryptococcus gattii*: A resurgent fungal pathogen', *Trends in Microbiology*, 19(11), pp. 564–571. doi: 10.1016/J.TIM.2011.07.010.

Chayakulkeeree, M. and Perfect, J. (2006) 'Cryptococcosis', *Infect Dis Clin North Am*, 20.

Chen, S. C. A., Meyer, W. and Sorrell, T. C. (2014) '*Cryptococcus gattii* infections', *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), pp. 980–1024. doi: 10.1128/CMR.00126-13.

Chen, Y. L. *et al.* (2013) 'Calcineurin governs thermotolerance and virulence of *Cryptococcus gattii*', *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 3(3), pp. 527–539. doi: 10.1534/G3.112.004242/-/DC1/FIGURES5.PDF.

Crawford, A. and Wilson, D. (2015) 'Essential metals at the host-pathogen interface: Nutritional immunity and micronutrient assimilation by human fungal pathogens', *FEMS Yeast Research*. Oxford University Press, p. 71. doi: 10.1093/femsyr/fov071.

D'Souza, C. A. *et al.* (2011) 'Genome Variation in *Cryptococcus gattii*, an Emerging Pathogen of Immunocompetent Hosts', *mBio*, 2(1). doi: 10.1128/mbio.00342-10.

Davis, M. J. *et al.* (2013) 'Macrophage M1/M2 Polarization Dynamically Adapts to Changes in Cytokine Microenvironments in *Cryptococcus neoformans* Infection'. doi: 10.1128/mBio.00264-13.

Delorme-Axford, E. *et al.* (2015) 'The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: An overview of methods to study autophagy progression', *Methods*, 75, pp. 3–12. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.12.008.

Delorme-Axford, E., Daniel, X. and Klionsky, J. (2018) 'Transcriptional and post-transcriptional regulation of autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*'. doi: 10.1074/jbc.R117.804641.

Diehl, C. *et al.* (2021) 'Zrg1, a cryptococcal protein associated with regulation of growth in nutrient deprivation conditions', *Genomics*, 113(2), pp. 805–814. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.01.023.

Ding, H. *et al.* (2018) 'ATG genes influence the virulence of *Cryptococcus neoformans* through contributions beyond core autophagy functions', *Infection*

and *Immunity*, 86(9), pp. 1–24. doi: 10.1128/IAI.00069-18.

Do, E. *et al.* (2016) 'The ZIP family zinc transporters support the virulence of *Cryptococcus neoformans*', *Medical Mycology*, 54(6), pp. 605–615. doi: 10.1093/mmy/myw013.

Doherty, C. P. (2007) 'Host-Pathogen Interactions: The Role of Iron', *The Journal of Nutrition*, 137(5), pp. 1341–1344. doi: 10.1093/JN/137.5.1341.

Eide, D. J. (2003) 'Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*', *The Journal of nutrition*, 133(5 Suppl 1). doi: 10.1093/JN/133.5.1532S.

Eide, D. J. (2009) 'Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*.' , *The Journal of biological chemistry*, 284(28), pp. 18565–9. doi: 10.1074/jbc.R900014200.

Ene, I. V. *et al.* (2014) 'Metabolism in fungal pathogenesis', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(12). doi: 10.1101/cshperspect.a019695.

Erwig, L. P. and Gow, N. A. R. (2016) 'Interactions of fungal pathogens with phagocytes', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, pp. 163–176. doi: 10.1038/nrmicro.2015.21.

Ferrareze, P. A. G. *et al.* (2021) 'Application of an optimized annotation pipeline to the *Cryptococcus deuterogattii* genome reveals dynamic primary metabolic gene clusters and genomic impact of RNAi loss', *G3 (Bethesda, Md.)*, 11(2). doi: 10.1093/G3JOURNAL/JKAA070.

Friedman, D. Z. P. and Schwartz, I. S. (2019) 'Emerging fungal infections: New patients, new patterns, and new pathogens', *Journal of Fungi*. MDPI AG. doi: 10.3390/jof5030067.

Fu, M. S. *et al.* (2021) 'Amoeba predation of *Cryptococcus neoformans* results in pleiotropic changes to traits associated with virulence', *mBio*, 12(2), pp. 1–25. doi: 10.1128/mBio.00567-21.

Garcia-Hermoso, D., Dromer, F. and Janbon, G. (2004) '*Cryptococcus neoformans* Capsule Structure Evolution In Vitro and during Murine Infection', *Infection and Immunity*, 72(6), p. 3359. doi: 10.1128/IAI.72.6.3359-3365.2004.

Garcia, A. W. A. *et al.* (2020) 'Participation of Zip3, a ZIP domain-containing protein, in stress response and virulence in *Cryptococcus gattii*', *Fungal Genetics and Biology*, 144(December 2019), p. 103438. doi: 10.1016/j.fgb.2020.103438.

Garelnabi, M. and May, R. C. (2018) 'Variability in innate host immune responses to cryptococcosis', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. Fundacao Oswaldo Cruz. doi: 10.1590/0074-02760180060.

Gibson, J. F. and Johnston, S. A. (2015) 'Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis', *Fungal Genetics and Biology*, 78, p. 76. doi: 10.1016/J.FGB.2014.11.006.

Gilbert, A. S., Wheeler, R. T. and May, R. C. (2015) 'Fungal pathogens: Survival and replication within macrophages', *Cold Spring Harbor Perspectives*

*in Medicine*, 5(7). doi: 10.1101/cshperspect.a019661.

Gordon, S. (2003) 'Alternative activation of macrophages', *Nature Reviews Immunology* 2003 3:1, 3(1), pp. 23–35. doi: 10.1038/nri978.

Hagen, F. *et al.* (2015) 'Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex', *Fungal Genetics and Biology*, 78, pp. 16–48. doi: 10.1016/J.FGB.2015.02.009.

Harding, T. M. *et al.* (1995) 'Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway', *The Journal of Cell Biology*, 131(3), p. 591. doi: 10.1083/JCB.131.3.591.

Harding, T. M. *et al.* (1996) 'Genetic and Phenotypic Overlap between Autophagy and the Cytoplasm to Vacuole Protein Targeting Pathway \*', *Journal of Biological Chemistry*, 271(30), pp. 17621–17624. doi: 10.1074/JBC.271.30.17621.

Hardison, S. E. *et al.* (2010) 'Pulmonary infection with an interferon- $\gamma$ -producing *Cryptococcus neoformans* strain results in classical macrophage activation and protection', *American Journal of Pathology*, 176(2), pp. 774–785. doi: 10.2353/AJPATH.2010.090634.

Harris, J. R. *et al.* (2011) '*Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen', *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 53(12), pp. 1188–1195. doi: 10.1093/CID/CIR723.

Hood, M. I. and Skaar, E. P. (2012) 'Nutritional immunity: Transition metals at the pathogen-host interface', *Nature Reviews Microbiology*, pp. 525–537. doi: 10.1038/nrmicro2836.

Hu, G. *et al.* (2008) 'PI3K signaling of autophagy is required for starvation tolerance and virulence of *Cryptococcus neoformans*', *Journal of Clinical Investigation*, 118(3), pp. 1186–1197. doi: 10.1172/JCI32053.

Huang, H. *et al.* (2015) 'Bulk RNA degradation by nitrogen starvation-induced autophagy in yeast.', *The EMBO journal*, 34(2), pp. 154–68. doi: 10.15252/embj.201489083.

Johnston, S. A. and May, R. C. (2013) 'Microreview *Cryptococcus* interactions with macrophages : evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen', 15(November 2012), pp. 403–411. doi: 10.1111/cmi.12067.

Jung, W. H. (2015) 'The zinc transport systems and their regulation in pathogenic fungi', *Mycobiology*. Korean Society of Mycology, pp. 179–183. doi: 10.5941/MYCO.2015.43.3.179.

Kawamata, T. *et al.* (2008) 'Organization of the Pre-autophagosomal Structure Responsible for Autophagosome Formation', *Molecular Biology of the Cell*, 19, pp. 2039–2050. doi: 10.1091/mbc.E07-10.

Kawamata, T. *et al.* (2017) 'Zinc starvation induces autophagy in yeast', *Journal of Biological Chemistry*, 292(20), pp. 8520–8530. doi: 10.1074/jbc.M116.762948.

Kihara, A. *et al.* (2001) 'Two Distinct Vps34 Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes Function in Autophagy and Carboxypeptidase Y Sorting in *Saccharomyces cerevisiae*', *The Journal of Cell Biology*, 152(3), p. 519. doi: 10.1083/JCB.152.3.519.

Kraft, C. and Martens, S. (2012) 'Mechanisms and regulation of autophagosome formation', *Current Opinion in Cell Biology*, pp. 496–501. doi: 10.1016/j.ceb.2012.05.001.

Kraft, C., Reggiori, F. and Peter, M. (2009) 'Selective types of autophagy in yeast', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(9), pp. 1404–1412. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.02.006.

Kwon-Chung, K. J. *et al.* (2014) '*Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(7). doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A019760.

Kwon-Chung, K. J. *et al.* (2017) 'The Case for Adopting the "Species Complex" Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis'. doi: 10.1128/mSphere.00357-16.

Kwon-Chung, K. J. and Varma, A. (2006) 'Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*?', *FEMS Yeast Research*, 6(4), pp. 574–587. doi: 10.1111/J.1567-1364.2006.00088.X.

Laity, J. H., Lee, B. M. and Wright, P. E. (2001) 'Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity', *Current Opinion in Structural Biology*, 11(1), pp. 39–46. doi: 10.1016/S0959-440X(00)00167-6.

Levitz, S. M. (1994) 'Macrophage-*Cryptococcus* interactions', *Immunology series*, 60, pp. 533–543. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8251592/> (Accessed: 6 March 2022).

Li, Y. H. and Liu, T. B. (2020) 'Zinc finger proteins in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. doi: 10.3390/ijms21041361.

Lin, X. and Heitman, J. (2006) 'The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex', <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142102>, 60, pp. 69–105. doi: 10.1146/ANNUREV.MICRO.60.080805.142102.

Lulloff, S. J., Hahn, B. L. and Sohnle, P. G. (2004) 'Fungal susceptibility to zinc deprivation', *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 144(4), pp. 208–214. doi: 10.1016/J.LAB.2004.07.007.

Lyons, T. J. *et al.* (2000) 'Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), pp. 7957–7962. doi: 10.1073/PNAS.97.14.7957.

Ma, H. and May, R. C. (2009) 'Chapter 5 Virulence in *Cryptococcus* Species', *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 131–190. doi: 10.1016/S0065-2164(08)01005-8.

MacDiarmid, C. W., Gaither, L. A. and Eide, D. (2000) 'Zinc transporters

that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*', *EMBO Journal*, 19(12), pp. 2845–2855. doi: 10.1093/EMBOJ/19.12.2845.

MacPherson, S., Larochelle, M. and Turcotte, B. (2006) 'A Fungal Family of Transcriptional Regulators: the Zinc Cluster Proteins', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(3), pp. 583–604. doi: 10.1128/MMBR.00015-06/ASSET/D511F06C-63CB-4C3F-8600-10CBF18465FB/ASSETS/GRAPHIC/ZMR0030621290005.JPEG.

Matsuura, A. *et al.* (1997) 'Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*', *Gene*, 192(2), pp. 245–250. doi: 10.1016/S0378-1119(97)00084-X.

May, R. C. *et al.* (2016) '*Cryptococcus*: From environmental saprophyte to global pathogen', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, pp. 106–117. doi: 10.1038/nrmicro.2015.6.

Mccormick, N. H. and Kelleher, S. L. (2012) 'ZnT4 provides zinc to zinc-dependent proteins in the trans-Golgi network critical for cell function and Zn export in mammary epithelial cells', *Am J Physiol Cell Physiol*, 303, pp. 291–297. doi: 10.1152/ajpcell.00443.2011.-Zinc.

Meijer, W. H. *et al.* (2006) 'ATG Genes Involved in Non-Selective Autophagy are Conserved from Yeast to Man, but the Selective Cvt and Pexophagy Pathways also Require Organism-Specific Genes', <http://dx.doi.org/10.4161/auto.3595>, 3(2), pp. 106–116. doi: 10.4161/AUTO.3595.

Miyabe, S., Izawa, S. and Inoue, Y. (2001) 'The Zrc1 Is Involved in Zinc Transport System between Vacuole and Cytosol in *Saccharomyces cerevisiae*', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(1), pp. 79–83. doi: 10.1006/BBRC.2001.4522.

Montes, H. M. *et al.* (2016) '*Cryptococcus* and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome'. doi: 10.3389/fmicb.2016.00105.

Moreno, M. Á. *et al.* (2007) 'The regulation of zinc homeostasis by the ZafA transcriptional activator is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence', *Molecular microbiology*, 64(5), pp. 1182–1197. doi: 10.1111/J.1365-2958.2007.05726.X.

Murray, P. J. *et al.* (2014) 'Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines', *Immunity*, 41(1), pp. 14–20. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2014.06.008.

Nakatogawa, H. *et al.* (2009) 'Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2009 10:7, 10(7), pp. 458–467. doi: 10.1038/nrm2708.

Ngamskulrunroj, P. *et al.* (2009) 'The trehalose synthesis pathway is an integral part of the virulence composite for *Cryptococcus gattii*', *Infection and Immunity*, 77(10), pp. 4584–4596. doi: 10.1128/IAI.00565-09/SUPPL\_FILE/IAI\_565\_09\_FIGURE\_S1\_LEGEND.DOC.

Ngamskulrunroj, P. *et al.* (2012) 'The Primary Target Organ of

*Cryptococcus gattii* Is Different from That of *Cryptococcus neoformans* in a Murine Model'. doi: 10.1128/mBio.00103-12.

Nobile, C. J. *et al.* (2009) 'Biofilm Matrix Regulation by *Candida albicans* Zap1', *PLoS Biology*, 7(6). doi: 10.1371/JOURNAL.PBIO.1000133.

Ohsumi, Y. (2014) 'Historical landmarks of autophagy research', *Cell Research*, 24(1), pp. 9–23. doi: 10.1038/cr.2013.169.

Oliveira, D. L. *et al.* (2016) 'The putative autophagy regulator Atg7 affects the physiology and pathogenic mechanisms of *Cryptococcus neoformans*', *Future Microbiology*, 11(11), pp. 1405–1419. doi: 10.2217/fmb-2016-0090.

Onodera, J. and Ohsumi, Y. (2005) 'Autophagy Is Required for Maintenance of Amino Acid Levels and Protein Synthesis under Nitrogen Starvation', *Journal of Biological Chemistry*, 280(36), pp. 31582–31586. doi: 10.1074/jbc.M506736200.

Press, P. *et al.* (2020) 'Melanin deposition in two *Cryptococcus* species depends on cell-wall composition and flexibility', *The Journal of Biological Chemistry*, 295(7), pp. 1815–1828. doi: 10.1074/jbc.RA119.011949.

Qureshi, A. *et al.* (2010) 'Role of Sphingomyelin Synthase in Controlling the Antimicrobial Activity of Neutrophils against *Cryptococcus neoformans*', *PLOS ONE*, 5(12), p. e15587. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0015587.

Rajasingham, R. *et al.* (2017) 'Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis', *The Lancet Infectious Diseases*, 17(8), pp. 873–881. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30243-8.

Ries, L. N. A. *et al.* (2018) 'Overview of carbon and nitrogen catabolite metabolism in the virulence of human pathogenic fungi', *Molecular Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 277–297. doi: 10.1111/mmi.13887.

Rocha, J. D. B. *et al.* (2015) 'Capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* modulate production of neutrophil extracellular traps (NETs) by human neutrophils'. doi: 10.1038/srep08008.

Rodrigues, M. L. *et al.* (2007) 'Vesicular Polysaccharide Export in *Cryptococcus neoformans* Is a Eukaryotic Solution to the Problem of Fungal Trans-Cell Wall Transport', *EUKARYOTIC CELL*, 6(1), pp. 48–59. doi: 10.1128/EC.00318-06.

Sabiiti, W. and May, R. C. (2012) 'Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*', *Future microbiology*, 7(11), pp. 1297–1313. doi: 10.2217/FMB.12.102.

Schneider, R. de O. *et al.* (2012) 'Zap1 Regulates Zinc Homeostasis and Modulates Virulence in *Cryptococcus gattii*', *PLoS ONE*. Edited by K. Nielsen, 7(8), p. e43773. doi: 10.1371/journal.pone.0043773.

Schneider, R. de O. *et al.* (2015) 'Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence', *Scientific Reports*, 5(1), p. 10104. doi: 10.1038/srep10104.

Schoffelen, T. *et al.* (2013) '*Cryptococcus gattii* Induces a Cytokine Pattern

That Is Distinct from Other Cryptococcal Species', *PLOS ONE*, 8(1), p. e55579. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0055579.

Seider, K. *et al.* (2010) 'Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape', *Current Opinion in Microbiology*, 13(4), pp. 392–400. doi: 10.1016/J.MIB.2010.05.001.

Sheldon, J. R. and Skaar, E. P. (2019) 'Metals as phagocyte antimicrobial effectors', *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Ltd, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.coi.2019.04.002.

Simm, C. *et al.* (2007) 'Saccharomyces cerevisiae vacuole in zinc storage and intracellular zinc distribution', *Eukaryotic cell*, 6(7), pp. 1166–1177. doi: 10.1128/EC.00077-07.

Springer, D. J. and Chaturvedi, V. (2010) 'Projecting Global Occurrence of *Cryptococcus gattii* - Volume 16, Number 1—January 2010 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC', *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), pp. 14–20. doi: 10.3201/EID1601.090369.

Staats, C. C. *et al.* (2013) 'Fungal zinc metabolism and its connections to virulence', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media SA. doi: 10.3389/fcimb.2013.00065.

Steenbergen, J. N., Shuman, H. A. and Casadevall, A. (2001) 'Cryptococcus neoformans interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(26), pp. 15245–15250. doi: 10.1073/PNAS.261418798.

SubramanianVignesh, K. *et al.* (2013) 'Granulocyte macrophage-colony stimulating factor induced Zn sequestration enhances macrophage superoxide and limits intracellular pathogen survival', *Immunity*, 39(4), pp. 697–710. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2013.09.006.

Sun, L. L. *et al.* (2013) 'Global Analysis of Fission Yeast Mating Genes Reveals New Autophagy Factors', *PLoS Genetics*, 9(8). doi: 10.1371/journal.pgen.1003715.

Suzuki, K. *et al.* (2007) 'Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization', *Genes to Cells*, 12(2), pp. 209–218. doi: 10.1111/J.1365-2443.2007.01050.X.

Tsuboi, S. (1992) 'Autophagy in Yeast Demonstrated with Proteinase-deficient Mutants and Conditions for its Induction', 119(2), pp. 3–8.

Vallabhaneni, S. *et al.* (2016) 'The Global Burden of Fungal Diseases', *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/j.idc.2015.10.004.

Velagapudi, R. *et al.* (2009) 'Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*', *Infection and Immunity*, 77(10), pp. 4345–4355. doi: 10.1128/IAI.00542-09/SUPPL\_FILE/SUPPLEMENTAL\_FIGURES.PDF.

Vignesh, K. S. *et al.* (2013) 'Zinc Sequestration: Arming Phagocyte Defense against Fungal Attack', *PLOS Pathogens*, 9(12), p. e1003815. doi:



10.1371/JOURNAL.PPAT.1003815.

Voelz, K. *et al.* (2014) “Division of labour” in response to host oxidative burst drives a fatal *Cryptococcus gattii* outbreak’, *Nature Communications* 2014 5:1, 5(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/ncomms6194.

Wang, Y. and Casadevall, A. (1994) ‘Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants.’, *Infection and Immunity*, 62(7), p. 3004. doi: 10.1128/iai.62.7.3004-3007.1994.

Waterman, S. R. *et al.* (2007) ‘Cell Wall Targeting of Laccase of *Cryptococcus neoformans* during Infection of Mice’, *INFECTION AND IMMUNITY*, 75(2), pp. 714–722. doi: 10.1128/IAI.01351-06.

Westman, J. *et al.* (2020) ‘Article Lysosome Fusion Maintains Phagosome Integrity during Fungal Infection II Article Lysosome Fusion Maintains Phagosome Integrity during Fungal Infection’, *Cell Host and Microbe*, 28(6), pp. 798-812.e6. doi: 10.1016/j.chom.2020.09.004.

Wilson, S. and Bird, Amanda J. (2016) ‘Zinc sensing and regulation in yeast model systems’, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 611, pp. 30–36. doi: 10.1016/j.abb.2016.02.031.

Wilson, S. and Bird, Amanda J (2016) ‘Zinc sensing and regulation in yeast model systems’. doi: 10.1016/j.abb.2016.02.031.

Xie, Z. and Klionsky, D. J. (2007) ‘Autophagosome formation: Core machinery and adaptations’, *Nature Cell Biology*, pp. 1102–1109. doi: 10.1038/ncb1007-1102.

Yamasaki, A. and Noda, N. N. (2017) ‘Structural Biology of the Cvt Pathway’, *Journal of Molecular Biology*, 429(4), pp. 531–542. doi: 10.1016/J.JMB.2017.01.003.

Yang, Z. and Klionsky, D. J. (2010) ‘Eaten alive: A history of macroautophagy’, *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 814–822. doi: 10.1038/ncb0910-814.

Zaragoza, O. *et al.* (2009) *Chapter 4 The Capsule of the Fungal Pathogen Cryptococcus neoformans*. 1st edn, *Advances in Applied Microbiology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/S0065-2164(09)01204-0.

Zaragoza, O. (2019) ‘Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*’, *Virulence*, 10(1), pp. 490–501. doi: 10.1080/21505594.2019.1614383.

Zhao, H. and Eide, D. (1996a) ‘The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(6), pp. 2454–2458. doi: 10.1073/PNAS.93.6.2454.

Zhao, H. and Eide, D. (1996b) ‘The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*’, *The Journal of biological chemistry*, 271(38), pp. 23203–23210. doi: 10.1074/JBC.271.38.23203.

Zhao, X. *et al.* (2019) ‘Conserved Autophagy Pathway Contributes to

Stress Tolerance and Virulence and Differentially Controls Autophagic Flux Upon Nutrient Starvation in *Cryptococcus neoformans*', *Frontiers in Microbiology*, 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.02690.

## ***CURRICULUM VITAE* resumido**

### **Dados pessoais**

**Nome:** Camila Diehl da Rosa

**Local e data de nascimento:** Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil  
11/09/1992

**Endereço profissional:** Avenida Bento Gonçalves, 9500, Bloco IV, Centro de Biotecnologia, Prédio 43421, Laboratório 219.

**Telefone profissional:** (51) 3308-6080

**Email:** diehlcr@gmail.com

### **Formação**

Bacharel em Biotecnologia Molecular (2011 – 2016)

### **Formação complementar**

Curso de curta duração em Fermentação, Biotecnologia e Cerveja, 2014. (Carga horária: 4h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Extensão universitária em Sequenciamento de DNA, 2014. (Carga horária: 15h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Extensão universitária em Bioinformatic Methods I, 2014. (Carga horária: 20h). University of Toronto, UTORONTO, Toronto, Canadá

Curso de curta duração em Curso de medicina personalizada (parte I e II), 2013. (Carga horária: 8h). Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brasil

Curso de curta duração em Simpósio de Biotecnologia, 2013. (Carga horária: 30h). Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil

Curso de curta duração em Uso e cuidados com animais de laboratório, 2012. (Carga horária: 4h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

### **Estágios**

Fundação de Ciência e Tecnologia (CIENTEC), Porto Alegre, Brasil. Estágio no Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Jun – Dezembro, 2016

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil  
Iniciação Científica

- 2014 – 2016 Projeto: “Prospecção de novos genes envolvidos no metabolismo de zinco em *Cryptococcus gattii*” – Bolsa de Iniciação Científica financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil. Orientador: Professor Dr. Charley C. Staats.
- 2012 – 2013 Projeto: “Estudo do papel dos fatores de reprogramação na etiologia do câncer” - Bolsa de Iniciação Científica financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil. Orientador: Professor Dr. Guido Lenz

### **Experiências profissionais**

- Assistente de professor, Ago – Dezembro, 2018 Nível: Graduação, Disciplina: Microbiologia Molecular Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Departamento de Biociências, Porto Alegre, Brasil
- Supervisão de projeto de Pesquisa, Jan – Dezembro, 2019 Supervisão de projeto desenvolvido por estudante para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil.
- Supervisão de projeto de Pesquisa, Jan – Agosto, 2021 Supervisão de projeto desenvolvido por estudante para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil.

## Publicações

- **Diehl, Camila**; Garcia, Ane Wichine Acosta; Kinskovski, Uriel Perin; Sbaraini, Nicolau; De Oliveira Schneider, Rafael; Ferrareze, Patricia Aline Gröhs; Gerber, Alexandra Lehmkuhl; De Vasconcelos, Ana Tereza Ribeiro; Kmetzsch, Livia; Vainstein, Marilene Henning; Staats, Charley Christian. **Zrg1, A cryptococcal protein associated with regulation of growth in nutrient deprivation conditions**. GENOMICS, v. 113, p. 805-814, 2021.
- Piffer, Alícia C.; Santos, Francine M. Dos; Thomé, Marcos P.; **Diehl, Camila**; Garcia, Ane Wichine Acosta; Kinskovski, Uriel Perin; Schneider, Rafael De Oliveira; Gerber, Alexandra; Feltes, Bruno César; Schrank, Augusto; Vasconcelos, Ana Tereza R.; Lenz, Guido; Kmetzsch, Lívia; Vainstein, Marilene H.; Staats, Charley C. **Transcriptomic analysis reveals that mTOR pathway can be modulated in macrophage cells by the presence of cryptococcal cells**. GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY, v. 44, p. e20200390, 2021.
- Garcia, Ane Wichine Acosta; Kinskovski, Uriel Perin; **Diehl, Camila**; Reuwsaat, Júlia Catarina Vieira; Motta De Souza, Heryk; Pinto, Helber Barboza; Trentin, Danielle Da Silva; De Oliveira, Haroldo Cesar; Rodrigues, Marcio L.; Becker, Emilene Mendes; Kmetzsch, Livia; Vainstein, Marilene Henning; Staats, Charley Christian. **Participation of Zip3, a ZIP domain-containing protein, in stress response and virulence in *Cryptococcus gattii***. FUNGAL GENETICS AND BIOLOGY, v. 144, p. 103438, 2020.
- Schneider, Rafael De Oliveira; **Diehl, Camila**; Dos Santos, Francine Melise; Piffer, Alícia Corbellini; Garcia, Ane Wichine Acosta; Kulmann, Marcos Iuri Roos; Schrank, Augusto; Kmetzsch, Lívia; Vainstein, Marilene Henning; Staats, Charley C. **Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence**. SCIENTIFIC REPORTS, v. 5, p. 10104, 2015