

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**METABOLISMO DE ZINCO EM *Cryptococcus gattii*:
CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMOS REGULATÓRIOS
DE TRANSPORTE**

Dissertação de Mestrado

Rafael de Oliveira Schneider

Porto Alegre, Outubro de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**METABOLISMO DE ZINCO EM *Cryptococcus gattii*:
CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMOS REGULATÓRIOS
DE TRANSPORTE**

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

Rafael de Oliveira Schneider

Orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, Outubro de 2012

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

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Charley Christian Staats, pelos ensinamentos, oportunidade e principalmente por confiar em minha capacidade.

Aos professores, Marilene Vainstein e Augusto Schrank, pela oportunidade e reconhecimento recebido.

Aos professores, Dr. Henrique Ferreira e Dr. Iran Malavazi, membros da comissão de acompanhamento.

A Livia, pela revisão da redação científica e pela sua natural capacidade de ensinar.

Aos colegas dos laboratórios 220 e 217, que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Luciano e a Silvinha, pelos auxílios durante o Mestrado.

A Natully, pela participação nos experimentos e companheirismo.

A Amanda, pela grande amizade e parceria.

A minha família, pelo apoio e investimento na minha formação.

Aos amigos, os quais demonstram que a amizade duplica as alegrias e divide as tristezas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior CAPES.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul FAPERGS.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	I
RESUMO	VI
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>	2
1.2 Criptococose.....	6
1.3 Sistemas de homeostase de metais e sua relação com a virulência em espécies patogênicas do gênero <i>Cryptococcus</i>	9
1.3.1 Ferro	10
1.3.2 Cobre.....	13
1.3.3 Zinco.....	14
1.3.4 A homeostase de zinco em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e em fungos patogênicos	16
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3. RESULTADOS.....	21
4. CAPÍTULO 1 – Manuscrito: Zap1 Regulates Zinc Homeostasis and Modulates Virulence in <i>Cryptococcus gattii</i>	22
5. CAPÍTULO 2 – Caracterização dos transportadores de zinco da família ZIP em <i>Cryptococcus gattii</i>	43
5.1 Introdução	43
5.2 Materiais e Métodos	44
5.2.1 Condições de cultivo	44
5.2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	45
5.2.3 qPCR em Tempo Real	45
5.3 Resultados	46
5.3.1 Identificação de genes codificantes para os transportadores de zinco da família ZIP no genoma de <i>C. gattii</i>	46
5.3.2 ZIP1 e ZIP3 possuem expressão regulada pela disponibilidade de ferro	47
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
BCS	sulfonato de batocuproina
BPDS	ácido bisulfônico de batofenantrolina
cDNA	DNA complementar
DNA	ácido desoxirribonucleico
EROs	espécies reativas de oxigênio
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
GPx	glutaciona peroxidase
GXM	glicurunoloxilomanana
H	hora
HIV	vírus da imunodeficiência humana
kDa	Kilodalton
RT-MMLV	transcriptase reversa do vírus da leucemia Maloney de camundongos
PCR	reação em cadeia da DNA polimerase
pH	potencial de hidrogênio iônico
RPM	rotações por minuto
SNC	sistema nervoso central
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis(2-piridil-metil)etilenodiamino
UV	ultravioleta
var	variedade
VG	variedade <i>gattii</i>
VN	variedade <i>neoformans</i>
ZIP	<i>Zrt, Irt-like Protein</i>

μl

microlitro

μm

micrometro

RESUMO

Cryptococcus gattii é uma levedura basidiomicética causadora da criptococose, doença que acomete diferentes órgãos de pacientes imunocompetentes, entre eles, pulmões, pele e sistema nervoso central. Durante o processo infeccioso, o fungo expressa diversos fatores de virulência, como a produção de melanina e cápsula polissacarídica, além de possuir a capacidade de replicar-se no interior de macrófagos. Em contrapartida, as células do hospedeiro também possuem estratégias para conter a disseminação do patógeno, uma delas é a imunidade nutricional, na qual ocorre redução da disponibilidade de nutrientes no sítio de infecção. A disponibilidade de zinco é um fator crucial para o desenvolvimento de uma infecção fúngica, mesmo assim, pouco se sabe sobre o metabolismo desse metal na espécie *C. gattii*. No presente trabalho, primeiramente, descrevemos o fator de transcrição Zap1 em *C. gattii*, a partir da análise *in silico* foi identificado um ortólogo do gene regulador da homeostase de zinco *ZAPI* de *Saccharomyces cerevisiae* do genoma de *C. gattii*. Foram realizadas análises de expressão, demonstrando que o gene selecionado possui sua expressão aumentada na condição de privação de zinco, comprovando assim, sua relação com a homeostase desse metal. Para caracterizar funcionalmente a proteína Zap1, linhagens mutante e mutante complementada para o gene *ZAPI* foram construídas e caracterizadas. A diminuição dos níveis de transcritos dos genes codificadores para os transportadores de zinco da família ZIP na linhagem mutante, concluímos que Zap1 regula positivamente a expressão desses genes. Na caracterização fenotípica, a linhagem mutante *zap1Δ* demonstrou maior sensibilidade à condição de privação de zinco do que a linhagem selvagem e mutante complementada, além de demonstrar altos níveis intracelulares de

espécies reativas de oxigênio (EROs) e maior sensibilidade as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) características que explicam a menor virulência da linhagem mutante quando comparada com a linhagem selvagem. Por meio da análise do transcriptoma demonstramos que Zap1 regula a expressão de genes envolvidos no metabolismo de zinco, estresse oxidativo e de genes codificadores para proteínas ligadoras de zinco. Secundariamente, na caracterização inicial de sistemas de aquisição de zinco em *C. gattii*, foram realizadas análises por PCR quantitativo em tempo real para avaliar os níveis de transcritos dos genes que codificam para transportadores de zinco da família ZIP. Um aumento significativo nos níveis de transcritos referentes ao gene ZIP3 (CNBG_5361), foi observado quando *C. gattii* foi cultivado em meio definido contendo o quelante de ferro BPDS ou o quelante de zinco TPEN, quando comparados à condição controle. Este fato sugere que o transportador Zip3 pode apresentar baixa seletividade, podendo transportar outros metais, em contraste aos transportadores Zip1 e Zip2, cuja modulação da expressão por BPDS foi menos acentuada.

ABSTRACT

Cryptococcus gattii is a basidiomycetous yeast that causes cryptococcosis, a life-threatening disease that can affect different organs of immunocompetent hosts, including, lungs, skin and central nervous system. During the infection process, the fungus express several virulence factors, such as melanin production and polysaccharide capsule, besides the ability to replicate inside macrophages. In contrast, the host cells express strategies to stop the spread of the pathogen, one of them is nutritional immunity, reducing nutrient availability in the infection site. Zinc availability is a crucial factor for fungal infection development, nevertheless, little is known about zinc metabolism in *C. gattii*. In the present work, firstly, we described Zap1 transcription factor in *C. gattii*. *In silico* analyses identified a *Saccharomyces cerevisiae* *ZAP1* ortholog in *C. gattii* genome. Expression analyses demonstrated that, *ZAP1* is positively regulated in zinc deprivation condition, confirming that the selected gene is involved in zinc metabolism. With the purpose to characterize the role of Zap1 in zinc metabolism, mutant and complemented strains were constructed and characterized. Expression analyses demonstrated that genes codifying for ZIP family of zinc transporter are up regulated by Zap1. On phenotypic characterization, mutant strain demonstrated higher sensibility to zinc deprivation condition when compared to wild type or complemented strain. Moreover, mutant strain demonstrated higher levels of reactive oxygen species (ROS) and higher sensibility to reactive nitrogen species (RNS). Transcriptomic analyses demonstrated that Zap1 regulates the expression of genes involved on zinc homeostasis, oxidative stress and genes codifying for zinc-binding proteins. Taken together, these results, explain the low virulence of mutant strain when compared to wild type and complemented strain. On the second part, on initial characterization of ZIP family

of zinc transporters, relative transcript levels of ZIP family codifying genes was measured on different conditions. ZIP3 (CNBG_5361) demonstrated higher transcript levels when *C. gattii* cells were cultured on iron deprivation condition, for that, iron chelating agent (BPDS) was add to the medium. These results suggest that, Zip3 may present low selectivity, and may carry other metal, in contrast to Zip1 and Zip2, that expression modulation by BPDS was less pronounced.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Com o surgimento de linhagens de patógenos resistentes às terapias quimioterápicas, fungos patogênicos tornaram-se um sério problema de saúde mundial, especialmente em pacientes imunocomprometidos, seja devido à epidemia da AIDS, seja por terapias imunossupressoras em transplantados ou ainda pacientes com câncer (Perlin, 2007). Apesar disso, apenas três tipos de drogas antifúngicas são utilizadas em casos de infecções sistêmicas, alertando para a necessidade de pesquisas para o descobrimento de novos alvos terapêuticos para infecções fúngicas (Simm *et al.*, 2011). Nesse contexto, a homeostase de metais demonstra-se ser um promissor alvo para esse tipo de pesquisa, pois níveis básicos de metais como ferro, cobre e zinco são essenciais para todos os organismos poderem sobreviver e proliferar, além disto, durante um processo infeccioso, esses metais são considerados fatores críticos para que o patógeno possa disseminar-se pelo organismo do hospedeiro, pois tanto as células do hospedeiro quanto as células do patógeno possuem estratégias bastante complexas para capturar esses microelementos (Schaible e Kaufmann, 2004). Nesse contexto, a homeostase de zinco é um potencial alvo de estudo para o desenvolvimento de drogas antifúngicas, sendo que alguns patógenos demonstram maior sensibilidade à privação de zinco do que a privação de ferro (Lulloff *et al.*, 2004).

Simm e colaboradores (2012) partiram do pressuposto que, mutantes nulos para transportadores de zinco perdem a capacidade de proliferar-se em ambientes com limitação de zinco, além de apresentarem virulência atenuada. Com isso, realizaram uma busca de novas

drogas antifúngicas as quais atuariam na homeostase de zinco. Para tal, utilizaram uma metodologia de fusão de um gene repórter, o qual codifica para a proteína fluorescente GFP, sob o controle de um promotor responsivo a zinco. Dessa maneira, foi possível avaliar a expressão do gene quando diferentes drogas foram utilizadas. Quando um composto químico era utilizado e causava o aumento dos níveis de GFP, concluía-se que a atuação dessa droga estava envolvida na homeostase de zinco. Diversas moléculas de diferentes classes terapêuticas foram encontradas como atuantes no metabolismo de zinco. Uma delas, Atovaquona, foi capaz de inibir um importante fator de virulência de *Candida albicans*, a filamentação. Desta forma, esta avaliação representa um grande avanço na área de busca por drogas terapêuticas relacionadas à homeostase de metais.

O metabolismo de zinco, diferentemente do metabolismo de ferro, ainda é pouco caracterizado nas espécies *C. neoformans* e *C. gattii* (Kronstad *et al.*, 2008). Sabe-se que, proteínas ligadoras de zinco são secretadas pelas células de defesa do hospedeiro, desempenhando papel importantíssimo no controle da disseminação de *C. neoformans* (Mambula *et al.*, 2000), ressaltando assim, a importância desse metal para o desenvolvimento da doença. Nesse contexto, o presente trabalho tem por objetivo caracterizar funcionalmente o fator de transcrição Zap1 em *C. gattii*, além de determinar sua relação com a virulência desse microrganismo. Demonstramos por diferentes metodologias que Zap1 compartilha diversas características com homólogos de diferentes espécies de fungos, além de apresentar papel essencial na virulência desse patógeno.

1.1 *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

Diversas espécies de fungos causam doenças em pacientes imunocomprometidos, enquanto outras são capazes de causar doenças em pacientes imunocompetentes. O complexo de espécies do gênero *Cryptococcus*, é capaz de causar doenças tanto em pacientes imunocomprometidos quanto em pacientes imunocompetentes (Perfect, 1989). Atualmente 37 espécies de fungos pertencentes ao gênero *Cryptococcus* estão descritas, embora a grande maioria não apresente risco à saúde humana, as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são patógenos que acometem tanto humanos quanto animais. Além dessas espécies, *C. laurentii* e *C. albidus* raramente podem acometer pacientes imunocomprometidos (Cheng *et al.*, 2001). Estima-se que a divisão do complexo de espécies *Cryptococcus* nas subespécies *C. neoformans* e *C. gattii* tenha ocorrido a aproximadamente 37 e 18 milhões de anos, respectivamente (Lin e Heitman, 2006). A espécie *C. neoformans* inicialmente era classificado em 4 sorotipos (A ao D) de acordo com as características de diferenças nos antígenos capsulares (Franzot *et al.*, 1999). Entretanto, com caracterizações moleculares, os sorotipos B e C passaram a ser classificados como uma nova espécie, denominada *C. gattii* (Kwon-Chung e Varma, 2006). Uma classificação por tipo molecular também foi realizada, classificação a qual separou as duas espécies em 4 diferentes tipos moleculares, onde a espécie *C. neoformans* passou a ser classificada como VNI, VNII, VNIII e VNIV, e a espécie *C. gattii* nos tipos VGI, VGII, VGIII e VGIV (Figura 1) (Meyer *et al.*, 1999; Ellis *et al.*, 2000).

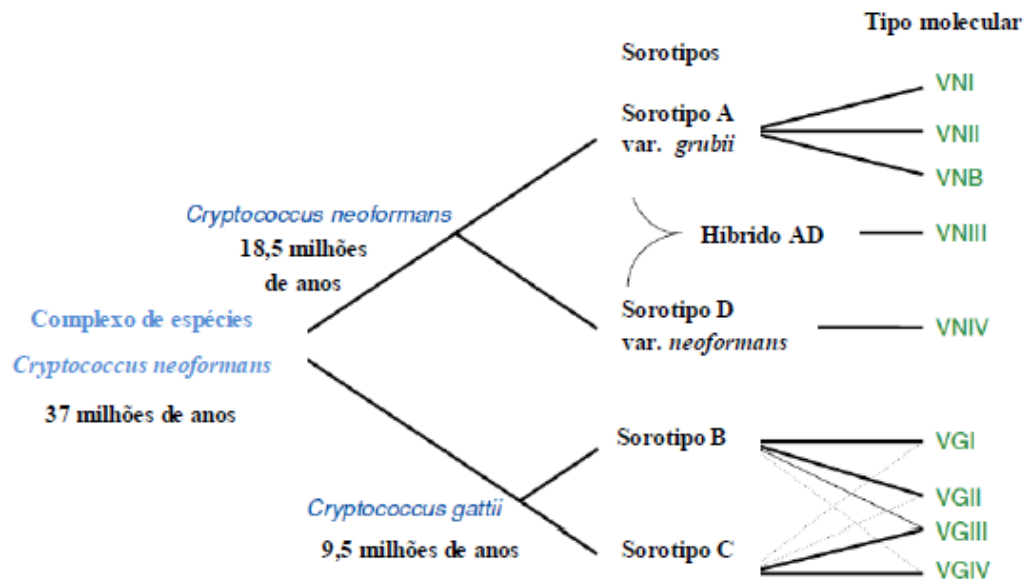


Figura 1. **Evolução do complexo de espécies *Cryptococcus*.** O complexo de espécies *Cryptococcus* possui duas subespécies, *C. neoformans* e *C. gattii*. A espécie *C. neoformans* é dividida em dois sorotipos, A e D, enquanto a espécie *C. gattii*, em B e C. Além disso, pelo menos 9 tipos moleculares são descritos. Adaptado de (Lin e Heitman, 2006).

A espécie *C. neoformans* é considerada saprófita, geralmente associada com excretas de aves, especialmente de pombos (Irokanulo *et al.*, 1997). Sabe-se que excretas de pombos oferecem um ambiente favorável para a divisão mitótica e *mating* desse fungo, sendo os sorotipos A, D e híbridos AD frequentemente encontrados nesse ambiente (Nielsen *et al.*, 2007). A infecção causada por *C. neoformans* ocorre principalmente em indivíduos imunocomprometidos, geralmente pacientes com AIDS, transplantados, com câncer ou que fazem tratamento com medicamentos imunossupressores (Pagano *et al.*, 2006; Moosbrugger *et al.*, 2008; Li e Mody, 2010). Estudos clínicos demonstram que a espécie *C. gattii* é restrita geograficamente (Kwon-Chung e Bennett, 1984), sendo inicialmente considerada uma espécie de regiões de clima subtropical e tropical (Sorrell, 2001). Essa espécie, normalmente isolada

de vegetais em decomposição, árvores e solo (Chakrabarti *et al.*, 1997), apresenta uma epidemiologia diferenciada em relação à espécie *C. neoformans*. A espécie *C. gattii* apesar de ser responsável por menos de 1% dos casos de criptococose no mundo (Lin, 2009), demonstra-se ser um patógeno de grande importância, pois esta possui a capacidade de causar a doença em hospedeiros imunocompetentes (Kwon-Chung e Varma, 2006). Além disso, um recente surto de criptococose ocasionado por uma linhagem hipervirulenta ocorrido na Ilha de Vancouver (Kidd *et al.*, 2004) e nos Estados Unidos (Byrnes e Heitman, 2009), aumentou a atenção dos grupos de pesquisa por este patógeno.

Durante o processo de uma infecção fúngica, muitas vezes, o patógeno necessita expressar fatores de virulência para que seu desenvolvimento ocorra no hospedeiro, dessa maneira, transpondo as barreiras impostas pelo sistema imune. Em *Cryptococcus*, alguns fatores de virulência já são bastante descritos, como a presença de uma cápsula polissacarídica, produção de melanina, capacidade de crescimento a 37°C (Perfect *et al.*, 1998) além de capacidade de proliferação intrafagossômica, o que permite a infecção do sistema nervoso central (He *et al.*, 2003). Dentre os fatores, a produção da cápsula polissacarídica é considerada o principal fator de virulência de *Cryptococcus*. Além de proteger a célula contra dessecação, sabe-se que atua como fator antifagocítico (Del Poeta, 2004), atua inibindo a liberação de citocinas pelas células de defesa, reduzindo o recrutamento de outras células do sistema imune para o sítio de infecção (Bose *et al.*, 2003) e, além disso, estudos realizados com as propriedades imunossupressivas de glucuroxilomanana, o qual é o principal componente da cápsula, demonstraram a capacidade desse componente em induzir apoptose em células T do hospedeiro (Pericolini *et al.*, 2006).

A produção de melanina é outro importante fator de virulência em *Cryptococcus*. Sabe-se que esse pigmento atua na proteção da célula contra radiação UV (Perfect *et al.*, 1998) e inibindo a resposta imune do hospedeiro, protegendo a célula contra agentes antioxidantes e contra a ação dos macrófagos (Zhu e Williamson, 2004). A síntese desse pigmento é realizada pela da enzima lacase, a qual é codificada pelo gene *LAC1*. Em um estudo realizado, mutantes nulos para esse gene demonstraram menor virulência do que a linhagem selvagem (Salas *et al.*, 1996), demonstrando a importância desse pigmento na patogenicidade desse microrganismo.

1.2 Criptococose

As espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são os principais agentes etiológicos da criptococose, doença que pode acometer diferentes órgãos do hospedeiro, como pulmões e pele, além de acometer o sistema nervoso central (SNC) (Sorrell, 2001). O início do processo de infecção ocorre geralmente pela inalação das células fúngicas dessecadas, as quais, devido ao seu pequeno tamanho de aproximadamente 3µm irão se depositar no interior dos alvéolos pulmonares, devido a essa potencial capacidade de iniciar o processo infeccioso, células dissecadas são consideradas potenciais propágulos de infecção. Similarmente, os esporos apresentam tamanhos ainda menores, de 1-2 µm (Botts *et al.*, 2009), os quais, além de serem mais resistentes no ambiente, são mais facilmente dispersos através do ar. Entretanto, a produção de esporos de *Cryptococcus* nunca tenha sido observada na natureza, o desenvolvimento sexual desse fungo foi demonstrado experimentalmente em plantas (Xue *et al.*, 2007). Após a inalação e conseqüente processo de infecção pulmonar, células de *C.*

neoformans e *C. gattii* disseminam-se pelo sistema hematogênico, onde por meio de diferentes estratégias as células fúngicas atravessam a barreira hematoencefálica ocasionando meningoencefalite, representando o quadro mais grave da doença (Figura 2) (Sorrell, 2001).

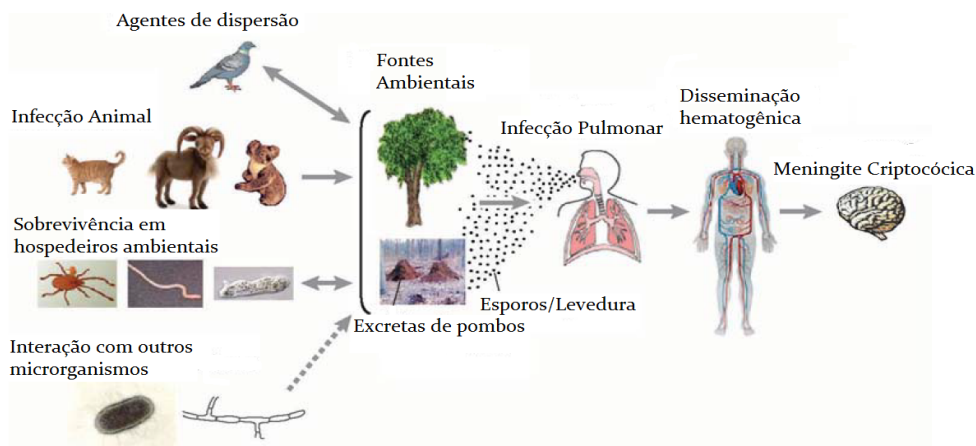


Figura 2. **Ciclo infeccioso de *Cryptococcus***. O fungo sobrevive no solo geralmente associado com excretas de pombos e em troncos de árvores, assim, possui a capacidade de infectar outros hospedeiros, como gatos, coalas e cabras. Os pombos são considerados a principal forma de dispersão do fungo. Além disso, as células fúngicas podem sobreviver em associação com predadores como, amebas, carrapatos e vermes. Como citado anteriormente, a principal forma de infecção ocorre por inalação de esporos ou células dessecadas, depositando-se no pulmão, ocorrendo disseminação hematogênica e infecção do SNC. Adaptado de (Lin e Heitman, 2006).

Estudos realizados para determinar os mecanismos de infecção de *Cryptococcus* demonstraram que esse fungo possui a capacidade de se aderir e de ser internalizado pelas células do epitélio pulmonar (Merkel e Cunningham, 1992). Além disso, a interação com macrófagos alveolares é o que permite a disseminação do fungo pelo organismo (Mansour e

Levitz, 2002). Uma vez internalizado, as células do fungo irão replicar-se e ocasionar acúmulo de vesículas contendo polissacarídeos, levando a formação de fagossomos onde irão localizar-se diversas células fúngicas (Feldmesser *et al.*, 2000). Após replicação intrafagossômica, por meio de um mecanismo denominado “Cavalo de Tróia”, as células fúngicas internalizadas podem atravessar a barreira hemato-encefálica, sendo posteriormente liberadas no SNC, com consequente possibilidade de disseminação pelos SNC. É importante citar que a capacidade de replicação intrafagossômica também permite a infecção hematogênica (Alvarez e Casadevall, 2006). Além do mecanismo “Cavalo de Tróia”, as células de *Cryptococcus* podem atravessar a barreira hemato-encefálica por meio de um mecanismo denominado transcitose, onde a célula adquire uma morfologia ovoide, logo no início da interação com células endoteliais (Figura 3) (Shi *et al.*, 2010).

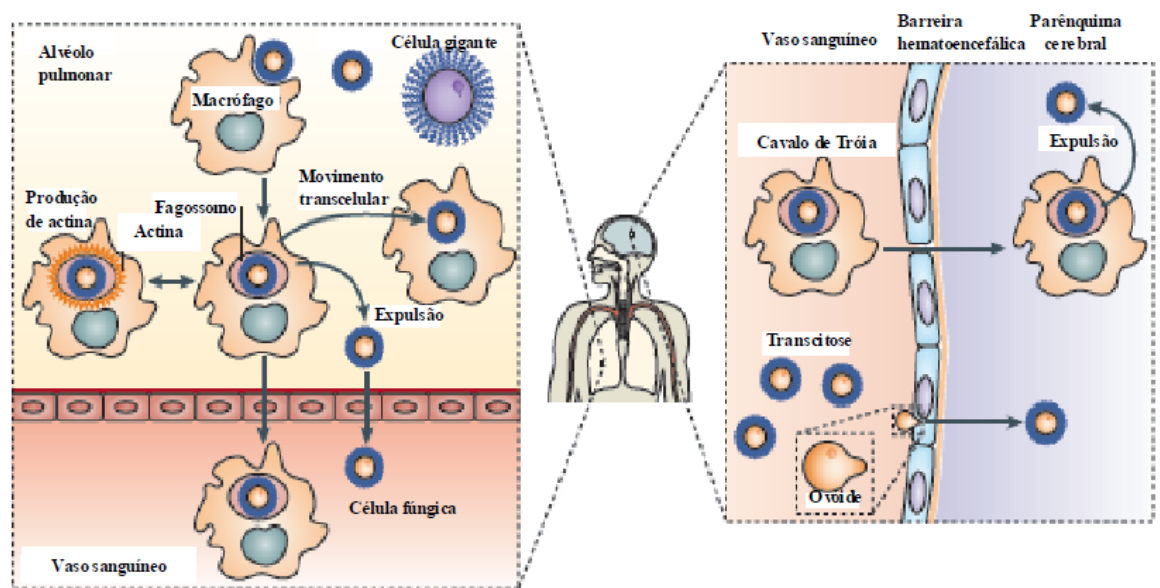


Figura 3. Mecanismos de disseminação de *Cryptococcus* pelo sistema hematogênico e pelo SNC. Logo após a inalação, as células de *Cryptococcus* são fagocitadas pelos macrófagos

alveolares e por outras células fagocíticas. Devido à capacidade de sobreviver e de replicar-se dentro dos macrófagos, ocorre disseminação hematogênica para o lado esquerdo. Infecção do SNC ocorre de duas maneiras: em uma das maneiras, a célula pode sofrer alterações morfológicas, adquirindo formato ovoide e interagindo com as células endoteliais cruzando a barreira hemato-encefálica por transcitose, o outro mecanismo, conhecido como “Cavalo de Tróia”, os macrófagos com *Cryptococcus* internalizados atravessam o endotélio, onde posteriormente ocorrerá a expulsão das células fúngicas para o lado direito. Adaptado de (Kronstad *et al.*, 2011).

A infecção causada por *C. neoformans* apresenta um quadro clínico diferenciado da causada por *C. gattii*. Além de apresentar níveis de mortalidade mais elevados, as lesões pulmonares e cerebrais apresentam-se na forma de infiltrados difusos. Já nas infecções causadas por *C. gattii*, onde normalmente ocorre a presença de criptococomas no cérebro e pulmões, necessita-se, muitas vezes, de intervenção cirúrgica para a remoção dos mesmos, porém, apesar de apresentar níveis mais baixos de mortalidade, altos níveis de morbidez neurológica e resposta fraca a terapia antifúngica ocorrem (Mitchell e Perfect, 1995).

1.3 Sistemas de homeostase de metais e sua relação com a virulência em espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*

Metais de transição como ferro, cobre, manganês e zinco são nutrientes essenciais e participam de uma grande diversidade de processos bioquímicos. Ferro e cobre, por exemplo, atuam como cofatores na cadeia transportadora de elétrons (Eide, 1998), zinco, o qual é considerado o segundo metal mais importante presente nas células, participa da atividade

catalítica ou na estabilidade estrutural de mais de 300 enzimas (Auld, 2001). Nesse contexto, tanto células de hospedeiros mamíferos quanto células de patógenos desenvolveram mecanismos para aquisição destes metais em condições de onde ocorre privação dos mesmos. Como exemplo, células de hospedeiros mamíferos reduzem a disponibilidade de ferro no local da infecção, dificultando assim a dispersão do patógeno (Weinberg, 2009). Além disso, sabe-se que a disponibilidade de ferro está diretamente envolvida com mudanças fenotípicas em *C. neoformans*, como por exemplo, baixa disponibilidade desse metal induz o aumento da cápsula polissacarídica e repressão da enzima lacase (Kronstad *et al.*, 2008).

1.3.1 Ferro

O papel do ferro na virulência de microrganismos já é bastante caracterizado, onde a competição entre patógeno e hospedeiro por esse metal é um aspecto crítico para o desenvolvimento de uma doença (Schaible e Kaufmann, 2004). Ferro está presente em baixas concentrações nos tecidos e fluídos corporais. A baixa concentração ocorre devido a presença de proteínas secretadas pelas células de mamíferos hospedeiros, como lactoferrinas e transferrinas (Bullen *et al.*, 2006). As transferrinas, as quais acumulam aproximadamente 1% do total de ferro presente corpo humano, efetivamente sequestram esses íons do plasma sanguíneo, preferencialmente em condições de pH neutro (Weinberg, 1974). Lactoferrinas, por sua vez, atuam quelando ferro preferencialmente em condições de pH ácido, normalmente em sítios de inflamação (Baveye *et al.*, 1999). Apesar da sua função de conter a disseminação do patógeno, transferrinas são importantes fontes de ferro para o patógeno *C. neoformans*, visto

que, mutantes para genes que codificam permeases de ferro, eventualmente são capazes de causar doença, sendo assim, sugere-se que existam mecanismos alternativos para aquisição desse íon. (Jung *et al.*, 2008).

Em um estudo realizado por Crestani e colaboradores (2012), uma análise comparativa do proteoma de *C. gattii* cultivado na condição de privação e disponibilidade de ferro foi realizada. Um total de 48 proteínas foi identificado exclusivamente quando o fungo é cultivado na condição de privação de ferro. Dentre as proteínas identificadas, UDP-glicose desidrogenase, a qual possui relação com formação capsular, e GMC-oxireductase que possui relação tanto com formação capsular quanto produção de melanina, apresentaram expressão elevada nesta condição. Demonstrando assim, a relação dos níveis de ferro e a virulência de *C. gattii*. Na espécie *C. neoformans* a homeostase de ferro também está diretamente relacionada com a virulência, sabe-se que resíduos de ácido glucurônico presentes na cápsula polissacarídica podem interagir com cátions divalentes. Essa associação, além de ser importante para a estrutura capsular, sugere-se que seja um mecanismo para concentrar ferro nas proximidades da superfície celular (Gómez e Nosanchuk, 2003). Além disso, sabe-se que a atividade e a expressão da enzima lacase está diretamente envolvida com a disponibilidade de ferro (Jacobson e Compton, 1996).

Fungos utilizam redutases presentes na superfície celular reduzindo íons férricos para posterior captação. Em *C. neoformans*, três mecanismos de redução de ferro são descritos: redutases de superfície celular, exportação de redutores como o ácido 3-hidroxi-antranílico 3HAA e o pigmento melanina presente na superfície celular (Jung *et al.*, 2008). Após redução do íon férrico, o transporte é realizado pela permease Cft1 e pela ferroxidase Cfo1, além disso,

o transportador de sideróforo Sit1 também atua transportando esse íon, presente em moléculas como heme e outros quelantes de ferro. Importante citar, que os genes os quais codificarão proteínas envolvidas na homeostase desse metal, possuem sua expressão regulada pelo fator de transcrição Cir1 (Figura 4) (Jung *et al.*, 2006), o qual participa do *mating* e da formação de filamentos nessa mesma espécie (Jung e Kronstad, 2011).

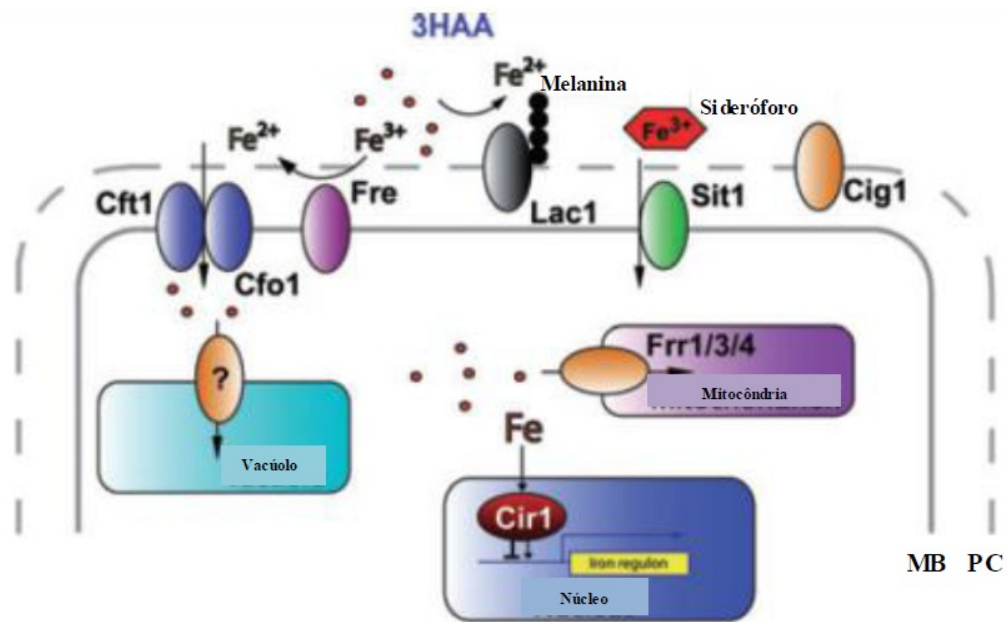


Figura 4. **Mecanismos de captura e homeostase de ferro em *Cryptococcus*.** Redutases de superfície Fre reduzem íon férrico em íon ferroso, onde posteriormente ocorrerá o transporte por meio de permeases (Jung *et al.* 2006) e ferroxidasas (Cfo1). Redutores extracelulares como o ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA), assim como a melanina também participam na redução iônica desse metal. Sit1 está representando o transportador de sideróforo e Cig1 e as proteínas mitocondriais Frr1, 2 e 3 que também participam na homeostase desse metal. A regulação da expressão desses genes é realizada pelo fator de transcrição Cir1. Adaptado de (Jung e Kronstad, 2008).

1.3.2 Cobre

O metal de transição cobre é requerido tanto por células de fungos patogênicos, quanto por células de hospedeiros mamíferos (Rees e Thiele, 2004), ocorrendo assim, uma grande competitividade entre células de hospedeiro e do patógeno pela aquisição desse metal. Sabe-se que pacientes com AIDS apresentam altos níveis de cobre no plasma, representando assim uma desvantagem frente a infecções causadas por *Cryptococcus neoformans* (Moreno *et al.*, 1998). Estudos recentes demonstram que o metal de transição cobre possui importante papel na virulência desse patógeno, onde pelo menos dois determinantes são dependentes de cobre: alteração nos níveis de Cu/Zn superóxido dismutase (Cox *et al.*, 2003) e indução da transcrição do gene *LAC1*, o qual irá codificar a enzima lacase (Salas *et al.*, 1996). Além desses determinantes, defeitos na homeostase desse metal, ocasionados por mutações de genes que codificarão transportadores de cobre, apresentaram maior sensibilidade à privação de cobre, redução na formação capsular, melanização e maior suscetibilidade à fagocitose (Chun e Madhani, 2010).

A homeostase de cobre em *Cryptococcus neoformans* tem sido caracterizada usando ferramentas de biologia e genética molecular. Uma das técnicas utilizadas é a construção de mutantes nulos para genes que codificam fatores de transcrição envolvidos no metabolismo de cobre e que codificam proteínas transportadoras desse metal. A linhagem mutante para o fator transcrição Cuf1, envolvido no metabolismo de cobre, demonstrou-se mais sensível à privação desse metal. Porém, não demonstrou defeitos na melanização nem na formação capsular (Waterman *et al.*, 2007). Em contrapartida, o mutante gerado para o transportador de cobre

CTR2, demonstrou má formação capsular, defeitos na melanização e maior suscetibilidade à fagocitose (Chun e Madhani, 2010). Nesse contexto, a Figura 5 esquematiza a regulação da homeostase de cobre em *C. neoformans*, demonstrando inclusive, sua participação em mecanismos de captura de ferro, através da ação da oxidoreductase Cfo1.

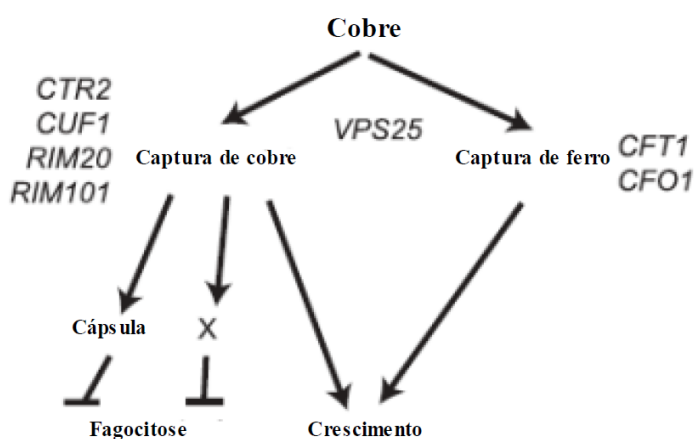


Figura 5. **Modelo da homeostase de cobre em *C. neoformans*.** O metal cobre é necessário para a captura de ferro através da ação da oxireductase Cfo1. A captura de cobre depende da ação dos genes *CTR2*, *CUF1*, *RIM20* e *RIM101*. Esse metal atua na formação da cápsula, inibição da fagocitose e crescimento do fungo. Adaptado de (Chun e Madhani, 2010).

1.3.3 Zinco

Zinco é um elemento essencial para todos os organismos. Em mamíferos, por exemplo, mesmo a moderada deficiência de zinco pode ocasionar problemas graves, como a anemia, defeitos nos sistema imune, problemas de desenvolvimento e teratogênese. Entretanto,

o excesso de zinco também é prejudicial para o organismo necessitando um controle rigoroso de sua homeostase na célula, sendo esse, exercido por diferentes mecanismos, como os mecanismos de captura de zinco (Eide, 2009) e proteínas que atuam no transporte intracelular desse metal (Palmiter e Findley, 1995). Nesse contexto, células fúngicas precisam manter níveis adequados de zinco intracelular, prevenindo também, o acúmulo desse metal no interior da célula (Quaife *et al.*, 1986). Além disso, devido ao fato de que muitos organismos demonstram uma maior suscetibilidade à privação de zinco do que a privação de ferro (Lulloff *et al.*, 2004), estudos tem sido desenvolvidos na busca por moléculas envolvidas no metabolismo de zinco, como alvo para o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas (Simm *et al.*, 2011).

A aquisição de zinco é o primeiro passo no estabelecimento de uma infecção, visto que este metal é altamente sequestrado por proteínas ligadoras de zinco, as quais são secretadas pelas células de hospedeiros mamíferos (Sugarman, 1983). Dentre estas proteínas, estão os complexos calprotectina, que são proteínas heterodiméricas e ligadoras de zinco, as quais compõem mais de 40% das proteínas citoplasmáticas (Santhanagopalan *et al.*, 1995). Estudos realizados demonstraram que frações citoplasmáticas de leucócitos inibem o crescimento de *C. neoformans*. A atividade inibitória foi relacionada com a presença de complexos calprotectina presentes no citoplasma das células de defesa, visto que a adição de $ZnCl_2$ reverteu a atividade inibitória da fração citoplasmática (Mambula *et al.*, 2000). Apesar da grande relação entre o metabolismo desse metal e a virulência do patógeno, pouco se sabe sobre o metabolismo de zinco em espécies do complexo *Cryptococcus*.

1.3.4 A homeostase de zinco em *Saccharomyces cerevisiae* e em fungos patogênicos

Em *Saccharomyces cerevisiae* o controle da homeostase de zinco já é mais bem caracterizada. Sabe-se que aproximadamente 3% do proteoma dessa levedura necessita de zinco para o correto funcionamento (Eide, 1998). O controle da homeostase de zinco é exercido pelo fator de transcrição Zap1p, ativando a expressão de genes relacionados à homeostase de zinco em resposta a deficiência desse metal (Zhao *et al.*, 1998). Análises de microarranjo demonstraram que, mais de 42 genes possuem sua expressão regulada por Zap1p em resposta a disponibilidade de zinco (Lyons *et al.*, 2000). Dentre os genes regulados por Zap1p estão os genes codificadores das proteínas transportadoras de zinco *ZRT1*, *ZRT2* (Zhao *et al.*, 1998) e *ZRT3* (Macdiarmid *et al.*, 2000). A Figura 6 demonstra esquematicamente a homeostase de zinco em *S. cerevisiae*, onde a captura de zinco é realizada principalmente por dois transportadores de membrana plasmática, um deles, considerado um sistema de alta afinidade, é a proteína codificada pelo gene *ZRT1*, o outro, de baixa afinidade, pelo gene *ZRT2*. Além disso, sabe-se que um aumento de expressão desses genes ocorre na condição de privação de zinco (Zhao e Eide, 1996b). Além desses genes, a proteína codificada pelo gene *ZRT3* também atua na homeostase desse metal. Esta proteína possui massa molecular predita de 55 kDa, não é proximamente relacionada com Zrt1p ou com Zrt2p, mas apesar disto, essas três proteínas são consideradas de uma mesma classe de transportadores, designado de transportadores de zinco da família ZIP (Gaither e Eide, 2001). Uma das características que une essas três proteínas em uma mesma classe de transportadores é que as três apresentam 8 domínios preditos transmembrana (Eng *et al.*, 1998).

Mutações nos genes codificadores para as proteínas Zrt1p e Zrt2p revelaram a existência de outros sistemas de captura de zinco de baixa afinidade em *S. cerevisiae*, um deles, é o transportador Fet4p, conhecido pelo seu papel no sistema de captura de baixa afinidade de ferro e cobre (Waters e Eide, 2002). Em outro estudo realizado, onde uma mutação causada no gene codificador para a proteína transportadora Pho84p, conferiu tolerância ao excesso de zinco além de reduzir o acúmulo desse metal, sugerindo assim, que esse transportador também está envolvido no transporte de zinco (Bun-Ya *et al.*, 1991). Além desses transportadores, outros também são descritos como importantes proteínas envolvidas na homeostase desse metal, no caso dos transportadores CDF, assim como os transportadores de zinco da família ZIP, apresentam motivos ricos em histidina localizados entre os motivos transmembrana, o que confere alta afinidade por metais durante o transporte (Persans *et al.*, 2001). Esses transportadores CDF, atuam principalmente como transportadores de atividade secundária, utilizando o gradiente de outros íons para o transporte de zinco (Eide, 2006).

Estudos sugerem que zinco é armazenado em vesículas no interior das células. Essas estruturas denominadas zincossomos, são encontradas em diferentes tipos celulares, como em células de mamíferos (Haase e Beyersmann, 2002). Zincossomos são estruturas também observadas células de leveduras (Figura 6), onde foi demonstrado que o acúmulo intracelular de zinco nessas estruturas depende do sistema de transporte de zinco Zrt1 (Devirgiliis *et al.*, 2004). Porém, a identidade e função desses compartimentos permanecem desconhecidas.

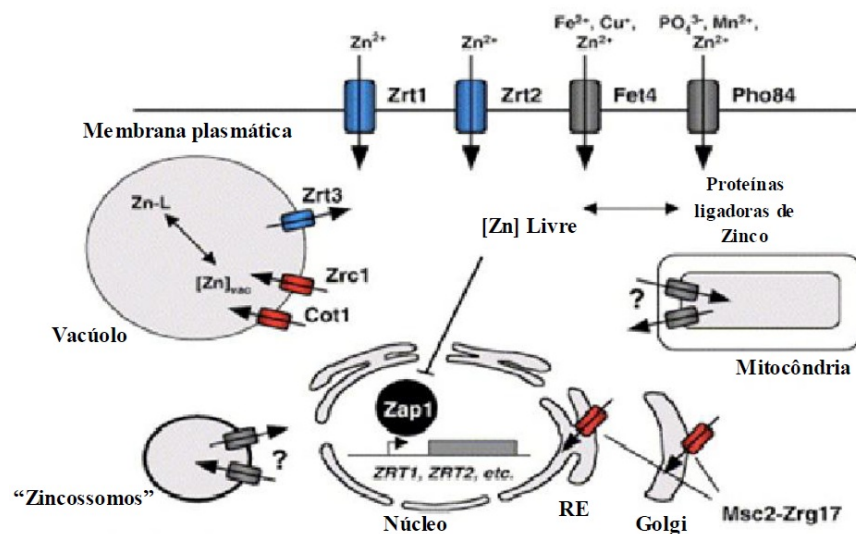


Figura 6. **Representação esquemática dos sistemas de captura de zinco em *S. cerevisiae*.** Os transportadores de zinco da família ZIP estão representados em azul, os transportadores de baixa afinidade Fet4 e Pho84 em cinza e os transportadores da família CDF em vermelho. O controle da expressão de diversos genes envolvidos na homeostase de zinco é realizado pelo fator de transcrição Zap1p. Adaptado de (Eide, 2006).

Em um estudo recentemente publicado, foi descrito o papel de uma proteína denominada Pra1, a qual é secretada por *Candida albicans* durante o processo de infecção. A proteína apresenta domínios de ligação a zinco, e após estar carregada com este metal, ocorre interação com o transportador de zinco Zrt1, transportando zinco para o citoplasma celular (Citiulo *et al.*, 2012). Além dessa proteína, o gene codificador da proteína Csr1p, em *C. albicans*, a qual é homóloga do fator de transcrição Zap1p de *S. cerevisiae*, também foi caracterizado. Linhagens mutantes para esse gene demonstraram severa sensibilidade à condição de privação de zinco, defeitos no crescimento filamentoso, virulência (Kim *et al.*, 2008) e formação de biofilme, com deposição de matriz extracelular. Além disto, demonstrou-se que Zap1 regula a expressão de genes envolvidos na formação de biofilme (Nobile *et al.*,

2009). Em virtude desses resultados, demonstra-se a importância da homeostase desse metal na virulência de fungos patogênicos.

Sabe-se que os níveis de Zn^{2+} livre no plasma sanguíneo são em torno de 4×10^{-4} vezes menor do que o mínimo requerido por *A. fumigatus* para que seu crescimento ocorra, sugerindo que esse patógeno, assim como outros, desenvolveu mecanismos de captura de zinco durante a infecção de tecidos do hospedeiro (Schaible e Kaufmann, 2004). Esse patógeno é capaz de desenvolver-se no pulmão de pacientes imunocomprometidos onde o ambiente é bastante alcalino e apresenta limitação de zinco, onde os íons Zn^{2+} estão fortemente ligados a proteínas ligadoras de desse metal (Tatsumi *et al.*, 1994). Entretanto, foi demonstrado que os transportadores de zinco ZrfA e ZrfB, os quais assemelham-se aos transportadores Zrt1/Zrt2 de *S. cerevisiae*, não são requeridos para o crescimento do fungo na condição de privação de zinco em pH neutro ou alcalino, sugerindo a presença de diversos outros genes envolvidos na captura desse metal (Vicentefranqueira *et al.*, 2005). Nesse contexto, análises do genoma de *A. fumigatus* demonstraram que este fungo possui 8 genes codificadores para transportadores de zinco da família ZIP, o que explica a capacidade de crescimento do fungo na condição de privação de zinco em pH neutro ou alcalino independentemente de ZrfA ou ZrfB (Amich *et al.*, 2009).

Assim como em *S. cerevisiae* e em *C. albicans*, um homólogo de Zap1p e Csr1p foi caracterizado em *A. fumigatus*. A proteína em questão, denominada ZafA, atua como ativador da transcrição, tendo sua própria expressão aumentada quando cultivado na condição de privação de zinco, além de ativar a expressão dos genes codificadores dos transportadores de zinco zrfA e zrfB quando cultivado nessa mesma condição. No mesmo trabalho, demonstrou-

se que o fator de transcrição ZafA é essencial para a virulência de *A. fumigatus*, onde camundongos infectados com a linhagem mutante para esse fator de transcrição apresentaram uma maior sobrevivência (15 dias) do que camundongos infectados com a linhagem selvagem (5 dias) (Moreno *et al.*, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar genes envolvidos na homeostase de zinco na levedura *C. gattii* e seu envolvimento com a virulência.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar *in silico* ortólogos de fatores de transcrição envolvidos com o metabolismo de zinco no genoma de *C. gattii*;
- Identificar *in silico* ortólogos de transportadores de zinco na família ZIP em *C. gattii*;
- Avaliar a expressão do ortólogo identificado, assim como dos transportadores de zinco da família ZIP, em condições de privação ou disponibilidade de zinco;
- Avaliar a expressão dos transportadores de zinco da família ZIP em condições de privação ou disponibilidade de cobre ou ferro;
- Construir mutante nulo e complementado para ZAP1;

- Avaliar a capacidade de desenvolvimento do mutante em condições de privação ou disponibilidade de zinco;
- Avaliar os genes regulados pelo fator de transcrição por meio de RNA-seq;
- Avaliar a virulência dos mutantes em modelos *ex vivo* e *in vivo* de patogenicidade.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos durante o período de Mestrado encontram-se divididos em dois capítulos. O Capítulo 1 consta da caracterização funcional do gene regulador da homeostase de zinco ZAP1 em *C. gattii*. A coleção de resultados propiciou a publicação de um artigo intitulado, “Zap1 Regulates Zinc Homeostasis and Modulates Virulence in *Cryptococcus gattii*” (Schneider *et al.*, 2012). O Capítulo 2, trata da caracterização inicial de transportadores de zinco da família ZIP em *C. gattii*.

4. CAPÍTULO 1 – Manuscrito: Zap1 Regulates Zinc Homeostasis and Modulates Virulence in *Cryptococcus gattii*

Zap1 Regulates Zinc Homeostasis and Modulates Virulence in *Cryptococcus gattii*

Rafael de Oliveira Schneider¹✉, Natully de Souza Süffert Fogaça¹✉, Lívia Kmetzsch¹, Augusto Schrank^{1,2}, Marilene Henning Vainstein^{1,2}, Charley Christian Staats^{1,2*}

1 Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, **2** Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Abstract

Zinc homeostasis is essential for fungal growth, as this metal is a critical structural component of several proteins, including transcription factors. The fungal pathogen *Cryptococcus gattii* obtains zinc from the stringent zinc-limiting milieu of the host during the infection process. To characterize the zinc metabolism in *C. gattii* and its relationship to fungal virulence, the zinc finger protein Zap1 was functionally characterized. The *C. gattii* ZAP1 gene is an ortholog of the master regulatory genes *zafA* and *ZAP1* that are found in *Aspergillus fumigatus* and *Saccharomyces cerevisiae*, respectively. There is some evidence to support an association between Zap1 and zinc metabolism in *C. gattii*: (i) ZAP1 expression is highly induced during zinc deprivation, (ii) ZAP1 knockouts demonstrate impaired growth in zinc-limiting conditions, (iii) Zap1 regulates the expression of ZIP zinc transporters and distinct zinc-binding proteins and (iv) Zap1 regulates the labile pool of intracellular zinc. In addition, the deletion of ZAP1 reduces *C. gattii* virulence in a murine model of cryptococcosis infection. Based on these observations, we postulate that proper zinc metabolism plays a crucial role in cryptococcal virulence.

Citation: Schneider RdO, Fogaça NdSS, Kmetzsch L, Schrank A, Vainstein MH, et al. (2012) Zap1 Regulates Zinc Homeostasis and Modulates Virulence in *Cryptococcus gattii*. PLoS ONE 7(8): e43773. doi:10.1371/journal.pone.0043773

Editor: Kirsten Nielsen, University of Minnesota, United States of America

Received: June 19, 2012; **Accepted:** July 25, 2012; **Published:** August 20, 2012

Copyright: © 2012 Schneider et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ –476029/2010-4), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: staats@cbiot.ufrgs.br

✉ These authors contributed equally to this work.

Introduction

The function of many proteins depends upon the essential role of Zn, acting as both a catalytic constituent and as a core component of structural motifs. The zinc metalloproteome consists of more than 300 proteins in yeast, and the majority of these proteins are zinc finger transcription factors [1]. The molecular mechanisms that control zinc homeostasis in cells are best characterized in *Saccharomyces cerevisiae*. The critical importance of zinc in yeast cells is suggested by the fact that approximately 3% of the proteome requires zinc for proper functioning [2]. Zinc acquisition from the environment, especially in zinc-limiting conditions, is mainly performed by the well-characterized ZIP family of plasma membrane transporters Zrt1p and Zrt2p [3,4] and by the multi-metal transporter Fet4p [5]. Intracellular transport of zinc to organelles, a process associated with high-zinc growth conditions, is mediated by the cation diffusion facilitator families Zrc1p, Cot1p and Msc2p [5–8]. The expression of the majority of these transporters is directly regulated by the master zinc regulator Zap1p [9], a multi-zinc finger transcription factor [4] that specifically binds to zinc-responsive elements in the promoter regions of over 40 genes in the yeast genome, including *ZRT1* and *ZRT2* [10].

Zinc is an indispensable micronutrient for all organisms. Pathogenic microorganisms require zinc for successful growth and development of infectivity [11]. Therefore, mammals limit

zinc availability as a defensive strategy against invading pathogens by forming zinc complexes with proteins such as calprotectin [12,13]. However, in comparison to the well-characterized microbial iron homeostasis system and its importance in host-pathogen interactions [14,15], relatively little is known about the role of zinc in the host-pathogen interplay in the infection milieu. Zinc metabolism studies in pathogenic fungi have mainly focused on *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. The *A. fumigatus* transcription factor *ZafA* is a functional homolog of *S. cerevisiae* Zap1p, and its transcript levels are regulated by zinc availability. Moreover, *ZafA* is associated with the regulation of the zinc transporter-encoding genes *zrfA* and *zrfB*, further underscoring its role in zinc homeostasis. Mutant cells lacking *ZafA* display attenuated virulence, as assessed in murine models of aspergillosis [16]. The functional homologues of *S. cerevisiae* Zap1p in *C. albicans* were identified in two independent studies and were named Csr1p [17] and Zap1 [18], respectively. *C. albicans* mutant cells lacking Csr1p display a severe growth reduction in low-zinc environments and defects in filamentous growth, an important virulence-associated trait [17]. In addition, this protein positively regulates the expression of zinc transporters [18], further reinforcing its role in zinc homeostasis.

The basidiomycete yeasts *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* are the etiological agents of cryptococcosis, a life-threatening disease mostly characterized by meningoencephalitis. Cryptococcosis is a

devastating disease in Africa and a major cause of death in immunosuppressed patients in many countries [19,20]. *C. neoformans* var *gubii* (serotype A) is the most prevalent cause of human cryptococcosis, accounting for over 95% of cryptococcal cases worldwide, while *C. gattii* infections account for less than 1% of cryptococcosis cases [21]. However, *C. gattii* is usually associated with cryptococcosis in immunocompetent individuals [22]. In addition, cryptococcosis outbreaks caused by a hypervirulent strain of *C. gattii* on Vancouver Island [23] and in the USA [24,25] reinforce the need for a thorough molecular characterization of the virulence determinants of this species. At least four well-characterized pathogenic determinants are shared by *C. neoformans* and *C. gattii*: (i) the presence of a polysaccharide capsule, (ii) the synthesis of a melanin-like pigment, (iii) the ability to proliferate at human body temperature and (iv) the ability to proliferate inside macrophages [26]. Nevertheless, only a few genes for other virulence determinants have been characterized in *C. gattii* to date [22].

Despite its importance, zinc metabolism is poorly characterized in both *C. neoformans* and *C. gattii*. This is in contrast to both iron metabolism [15] and copper metabolism [27,28], which have been well-studied. Zinc chelation by calprotectin impairs the growth of *C. neoformans*, and this mechanism is also likely to be important during interactions between cryptococcal cells and neutrophils and other immune cells [29]. Here, we characterized the *ZAPI* gene and its role as a transcriptional regulator of zinc metabolism in *C. gattii*. *ZAPI* shares structural and functional features with other fungal zinc regulators, and functional analysis revealed that Zap1 regulates the expression of several genes involved in zinc metabolism. In addition, the results of this study demonstrate that Zap1 is necessary for key events in various cryptococcal pathogenesis-related mechanisms.

Results

Identification of the C₂H₂ Zn-finger transcription factor Zap1 in *C. gattii*

Scrutiny of the *C. gattii* R265 genome [30] using the *S. cerevisiae* zinc finger metalloregulatory protein Zap1p revealed the presence of 25 predicted C₂H₂ zinc finger domain-containing proteins. Considering that *S. cerevisiae* Zap1p is characterized by a concentration of zinc fingers in its C-terminus [4], proteins without this feature were not considered for further analysis. The best-hit protein matching these criteria is encoded by the gene CNBG_4460, which contains four C₂H₂ domains. As previously demonstrated, *S. cerevisiae* Zap1p possesses seven zinc finger binding domains [4]. Thus, a direct comparison of the predicted CNBG_4460 encoded protein with the orthologs of the *C. neoformans* H99 and JEC21 strains was performed. The overall identity between proteins from the two *C. neoformans* strains was very high (>98%). However, when each predicted *C. neoformans* protein was compared to the putative *C. gattii* protein, the similarity was found to be only 78% (Figure S1), which may be due to a gap in the sequence corresponding to the C-terminus of the *C. gattii* protein. Analysis of the CNBG_4460 locus sequence relative to proteins from both *C. neoformans* strains was conducted employing the Gene Wise algorithm (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/Wise2/>) to search for possible frameshift or annotation errors. The resulting sequence of the *C. gattii* Zap1 protein displayed increased identity with proteins from both *C. neoformans* strains (84%), and the similarity is likely due to the presence of an additional 70-bp exon (Figure S1). Moreover, RNA-seq confirmed the presence of an extra exon in the C-terminal coding region of the *C. gattii* *ZAPI* gene. In this way, the proposed annotation for

the *C. gattii* *ZAPI* gene is quite identical to the *C. neoformans* orthologs (Figure S1). Thus, the *ZAPI* gene encodes a 699-aa protein containing six C₂H₂ zinc finger domains that are distributed along its sequence, as observed in fungal Zap1 functional homologs (Figure 1A). The domain architecture in *C. gattii* Zap1 protein is similar to those observed in *C. neoformans* functional homologs. Additionally, phylogenetic analysis (Figure 1B) including Zap1 sequences from different fungal species demonstrated that *C. gattii* Zap1 is highly similar to Zap1 from *C. neoformans* and *A. fumigatus* but less similar to Zap1 from *C. albicans*.

The expression of Zap1p is regulated by zinc levels in *S. cerevisiae* [4]. To further characterize the functional homology of *C. gattii* Zap1, the transcript levels from the *ZAPI* gene were assessed by qRT-PCR analysis using RNA isolated from *C. gattii* that were cultured in both the presence and the absence of the zinc chelator TPEN. A significant increase in *ZAPI* transcripts (25-fold) was detected in zinc-limiting conditions compared to control conditions (Figure 1C), suggesting a possible role for *C. gattii* Zap1 in zinc metabolism. An increase in the transcript levels of distinct ZIP family zinc transporters (*ZIP1* – CNBG_6066, *ZIP2* – CNBG_2209, and *ZIP3* – CNBG_5361) could also be detected in the same experimental conditions (Figure 1D). This result indicates the utility of TPEN as a tool to evaluate the zinc deprivation responsiveness of *C. gattii*, and confirms that *ZAPI* transcript levels can be regulated by zinc availability.

C. gattii Zap1 regulates zinc transport and growth during zinc deprivation

To evaluate the function of Zap1 in *C. gattii*, null mutants and complemented strains were constructed. Knockout and complementation of the *ZAPI* gene were confirmed by both Southern blotting and RT-PCR analysis (Figure S2). To evaluate the role of *C. gattii* Zap1 in zinc homeostasis, the ability of WT, *zap1Δ* mutant and *zap1Δ::ZAPI* complemented strains to grow in zinc-limiting conditions (YNB containing TPEN) were assayed. Zinc deprivation induced decreased growth in all strains analyzed in comparison to their growth in zinc-rich medium. However, this growth reduction was much more pronounced in the *zap1Δ* mutant (Figure 2A). To evaluate the possibility that the growth arrest in *zap1Δ* mutants exposed to zinc deprivation conditions might be related to lower intracellular zinc levels, fluorometric analyses were performed with the cell permeable zinc probe FluoZin – 1 AM. Relative fluorescence levels of *zap1Δ* mutant were approximately 5 times lower than those of the WT strain and were comparable to background fluorescence levels obtained from the treatment of WT and *zap1Δ* mutant cells with the membrane permeable TPEN (Figure 2B). Because fungal Zap1 orthologs regulate the expression of ZIP family zinc transporters [16,18,31], qRT-PCR analyses were conducted to evaluate the relative transcript levels of three genes encoding ZIP domain containing proteins. The expression of two of these genes (*ZIP1* – CNBG_6066 and *ZIP2* – CNBG_2209) was regulated by Zap1 because the relative transcript levels of these genes were drastically reduced in the *zap1Δ* mutant cells compared to WT cells (Figure 2C). Collectively, these results confirm that *C. gattii* Zap1 plays a key role in the regulation of zinc homeostasis.

C. gattii cells lacking Zap1 display alterations in oxidative stress pathways

Zinc deficiency generates a burst of oxidative stress in *S. cerevisiae* cells, and the adaptive responses to overcome some of the damage caused by reactive oxygen species (ROS) can be mediated by Zap1p [32]. Assays to evaluate the sensitivity of WT, *zap1Δ*

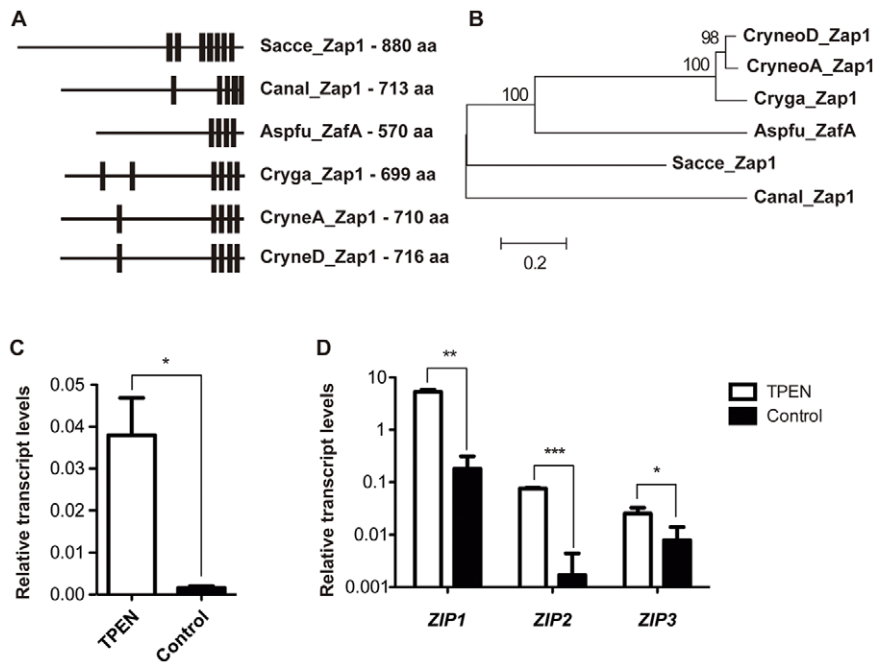


Figure 1. Identification of the ZAP1 zinc regulator in *C. gattii*. A. The zinc finger domain architecture was evaluated using the ScanProsite tool employing the consensus sequence C-X(2,4)-C-X(12)-H-X(3,5)-H [16] in the ZAP1 homologs of different fungi: *S. cerevisiae* ZAP1 (Sacce_Zap1 – Genbank NP_012479.1), *A. fumigatus* ZafA (Aspfu_ZafA – Genbank ABJ98717.1), *C. albicans* ZAP1 (Canal_Zap1 – Genbank XP_717199.1), *C. neoformans* serotype D ZAP1 (CryneoD_Zap1 – Genbank XP_572252), *C. neoformans* serotype A ZAP1 (CryneoA_Zap1 – Broad Institute CNAG_05392) and *C. gattii* ZAP1 (Cryga_Zap1 – Broad Institute CNBG_4460). The zinc finger domain is represented by black bars, and the length of each protein sequence (in amino acids) is indicated to the right. B. Phylogenetic analysis applying the Neighbor-Joining method and including Zap1 sequences from distinct fungi. The bar marker indicates the genetic distance, which is proportional to the number of amino acid substitutions. C. Quantitative real time RT-PCR of ZAP1 gene transcripts after growth of *C. gattii* in YNB with or without TPEN. D. Quantitative real time RT-PCR of ZIP gene transcripts after growth of *C. gattii* in YNB with or without TPEN. The measured quantity of the mRNA in each of these samples was normalized using the Ct values obtained for the actin gene. Data are shown as the mean \pm SD from three experimental replicates of three biological replicates. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0043773.g001

mutant and *zap1Δ::ZAP1* complemented strains to hydrogen peroxide, menadione or T-BOOH revealed no differences in their relative growth when exposed to these distinct ROS generators (data not shown). However, assays employing the intracellular fluorescent ROS probe CM-H2CFDA revealed an accumulation of ROS in mutant cells, compared to the level in WT and complemented strains, after cultivation in YNB with TPEN (Figure 3A). To gain insight into this phenomenon, the relative transcript levels of three catalase- (*CAT1* – CNBG_4696, *CAT2* – CNBG_5786 and *CAT3* – CNBG_4667) and two superoxide dismutase (SOD)-encoding genes (*SOD1* – CNBG_0599 and *SOD2* – CNBG_2661) were measured by qRT-PCR. Comparison of the relative transcript levels of the *CAT* genes from WT and *zap1Δ* mutant cells revealed no statistically significant differences (Figure 3B). Nevertheless, a slight increase (1.9-fold) was observed in the levels of the Cu-Zn SOD encoded by CNBG_0599 but not in the Mn SOD encoded by CNBG_2661 (Figure 3C).

The accumulation of intracellular ROS in *C. gattii zap1Δ* mutant cells suggested that other mechanisms might also be involved in the regulation of ROS homeostasis in such cells. The *S. cerevisiae* Zap1p is also known for its role in the regulation of the expression of distinct genes involved in sulfur and glutathione metabolism [33,34]. To test this possibility, the sensitivity of *zap1Δ* mutant cells to the glutathione depletion agent diethyl malate (DEM) was examined. While the addition of DEM to WT or *zap1Δ::ZAP1* complemented strains reduces their growth to approximately 60% of the level of non-treated cultures, it caused a more intense growth inhibition in the *zap1Δ* mutant strain to approximately

40% of the level of non-treated cultures (Figure 4A). This result suggests that the lack of *ZAP1* leads to a reduction in glutathione levels in these cells. In an attempt to correlate the proposed diminished glutathione levels with the elevated intracellular ROS levels, the relative transcript levels of two glutathione peroxidase (GPx)-encoding genes (*GPX1* – CNBG4202 and *GPX2* – CNBG5153) were evaluated. GPxs catalyze the reduction of hydrogen peroxide with the consumption of reduced glutathione, yielding oxidized glutathione [35]. The relative *GPX2* gene transcript levels were 4 times higher in the *zap1Δ* mutant compared to WT cells (Figure 4B), confirming an imbalance in glutathione and ROS metabolism in the absence of *ZAP1*. In addition, analysis of the sensitivity of WT cells, *zap1Δ* mutants and *zap1Δ::ZAP1* complemented strains to the reactive nitrogen species (RNS) generator DETA-NONOate revealed that the absence of *ZAP1* gene activity leads to a marked decrease in the viability of the *zap1Δ* mutant compared to the WT or complemented strains (Figure 5).

Effects of ZAP1 deletion on *C. gattii* virulence

The *zap1Δ* strain was evaluated for its ability to synthesize melanin and capsule and for its ability to grow at 37°C, as these are the most well studied virulence factors of *C. gattii* [26]. The lack of *ZAP1* does not interfere with any of these traits (Figure S3), but a decrease in the ability to cause experimental cryptococcosis was observed in *zap1Δ* cells. Using an intranasal model of murine infection, we found that mice infected with the *ZAP1* null mutant

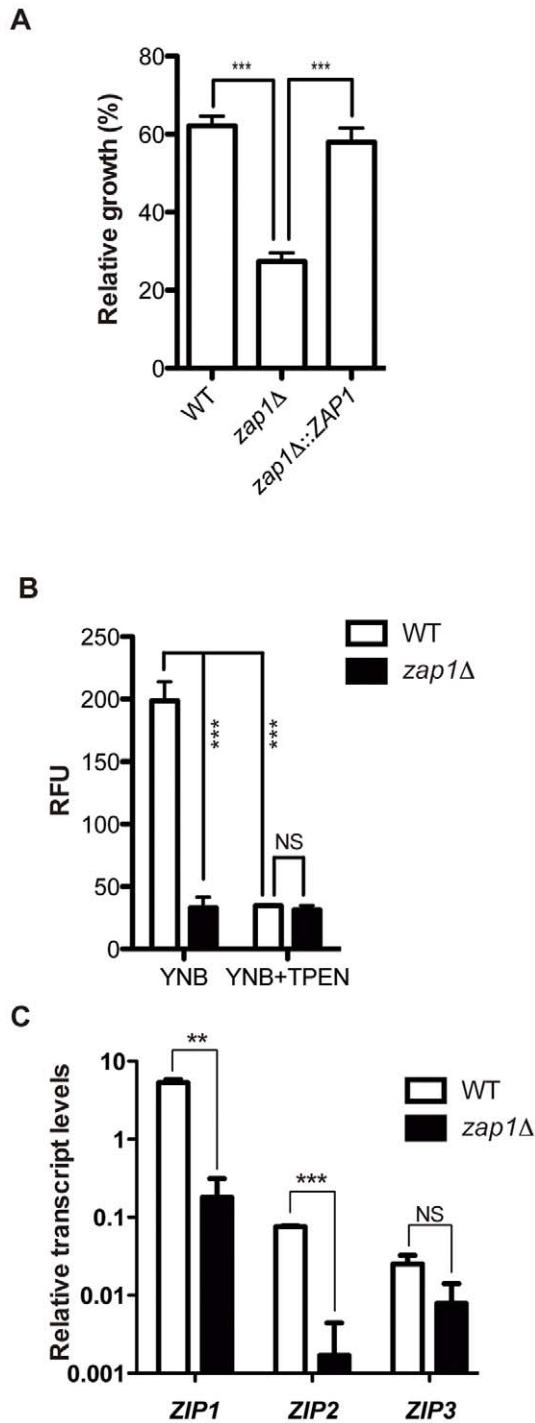


Figure 2. *C. gattii* ZAP1 null mutants are defective in zinc metabolism. (A) Growth of the WT, *zap1Δ* mutant and *zap1Δ::ZAP1* complemented strains in low-zinc or control media was evaluated spectrophotometrically. The ratio between growth in low-zinc and control conditions is shown as the mean \pm SD from three biological replicates. (B) Fluorometric determination of intracellular zinc was accomplished using the probe FluoZin-1-AM. The relative zinc concentration was determined based on the fluorescence in WT or *zap1Δ* mutant cells cultured in YNB or YNB +10 μ M TPEN as a control to determine the level of background fluorescence. Bars represent the mean of the cell count of normalized fluorescence levels. (C) Quantitative real time RT-PCR of ZIP gene transcripts after growth of the *C. gattii* WT or *zap1Δ* mutant in YNB + TPEN. The measured quantity of the mRNA in each of the samples was normalized using the Ct values

obtained for the actin gene. Data are shown as the mean \pm SD from three experimental replicates of three biological replicates. *** $P < 0.01$. **** $P < 0.001$. NS, not significant.

doi:10.1371/journal.pone.0043773.g002

survived longer (median survival 11.5 days) than those infected with the WT ($P = 0.0078$) and complemented strains ($P = 0.0253$) (median survival 6 and 6.5 days, respectively; Figure 6A). In this context, interactions between yeast cells and macrophages play a pivotal role in the pathobiology of *C. neoformans* [36]. To evaluate whether the lower virulence of the *zap1Δ* mutant is associated with changes in the interplay between macrophages and *C. gattii*, phagocytosis assays were performed employing the macrophage cell-like RAW264.7 line. Assays with the WT, *zap1Δ* mutant and *zap1Δ::ZAP1* complemented strains revealed that cells lacking ZAP1 have increased CFU counts after 18h of interaction with macrophages (Figure 6B). In conjunction, these results confirm the role of ZAP1 in *C. gattii* virulence.

ZAP1 regulates the expression of zinc transporters, oxidative stress-related proteins and zinc-binding proteins

To evaluate the response of the ZAP1 regulon to zinc deprivation, RNA-seq analyses were conducted using RNA isolated from WT or *zap1Δ* mutant cells after a 2-h exposure to TPEN, as this condition promotes the intense expression of ZAP1 and ZIP zinc transporters (Figure 1C and 1D). Analysis of the two transcriptomes revealed a total of 183 and 328 genes that were significantly ($p < 0.05$) up-regulated and down-regulated, respectively, in WT cells compared to *zap1Δ* mutant cells. As expected, two ZIP zinc transporters were found among the up-regulated genes, providing a positive control for the analysis. In addition, one gene related to nitrosative stress, the flavohemoglobin encoding gene, was also up-regulated in WT cells (Table 1). The full list of ZAP1-regulated genes and the corresponding fold-changes are shown in Table S1. To further characterize the genes regulated by ZAP1 in *C. gattii*, a screen for genes encoding putative zinc-binding proteins was conducted, employing gene ontology (GO) classification after analysis on the UFO server [37]. Among the 183 WT up-regulated genes analyzed, four zinc-binding proteins were detected, and all are transcription factors containing distinct zinc finger domains (Table 1). However, when the 328 WT down-regulated genes were subjected to the same analysis, thirteen different genes encoding putative zinc-binding proteins were identified. The majority of these genes encode proteins with dehydrogenase activity, and only two encode zinc finger transcription factors (Table 1).

Discussion

Zinc is a fundamental micronutrient in cell physiology, as it is a key component of the cores of several proteins [38]. Fungal cells have evolved a regulatory mechanism to acquire and distribute zinc inside cells [32]. In all fungal systems characterized to date, including *S. cerevisiae*, *C. albicans* and *A. fumigatus*, the Zap1p transcription factor and its functional homologs control zinc homeostasis through the modulation of zinc transporter and zinc-binding protein expression [4,16–18]. In the present study, the functional homolog of *S. cerevisiae* Zap1p was characterized in *C. gattii*, allowing us to analyze the influence of zinc in cryptococcal virulence. Four lines of evidence support the assumption that Zap1 is a zinc-responsive transcriptional regulator that is responsible for zinc homeostasis in *C. gattii*. First, ZAP1 transcript levels increase in response to zinc deprivation. Second, *in silico* analysis of the predicted Zap1 protein sequence identified several C₂H₂ zinc

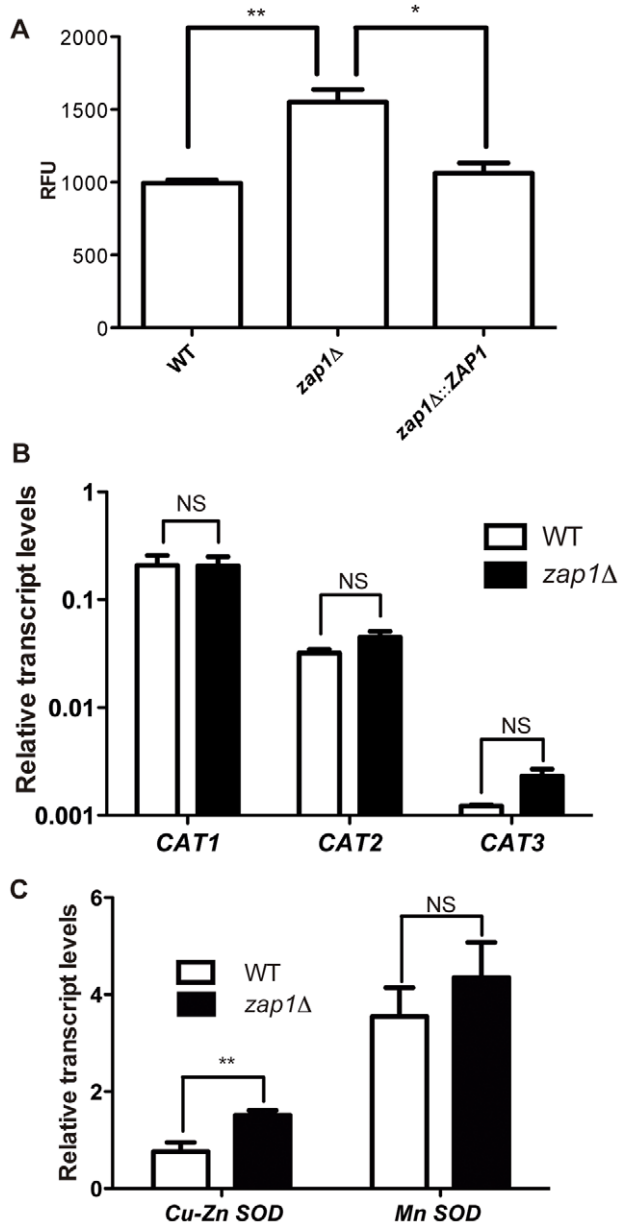


Figure 3. Disruption of *ZAP1* generates an imbalance in ROS metabolism. (A) Fluorometric determination of intracellular ROS levels employing the probe CM-H2DCFDA. The relative ROS levels were determined based on the fluorescence in WT, *zap1Δ* mutant or *zap1Δ::ZAP1* complemented cells cultured in YNB + TPEN. Bars represent the mean of the cell count with normalized fluorescence levels. (B) Quantitative real time RT-PCR of *CAT* gene transcripts after growth of *C. gattii* WT or *zap1Δ* mutant cells in YNB + TPEN. (C) Quantitative real time RT-PCR of *Mn-SOD* or *Cu/Zn-SOD* gene transcripts after growth of the *C. gattii* WT or *zap1Δ* mutant cells in YNB + TPEN. The measured quantity of the mRNA in each of the samples was normalized using the Ct values obtained for the actin gene. Data are shown as the mean \pm SD from three experimental replicates of three biological replicates. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. NS, not significant. doi:10.1371/journal.pone.0043773.g003

finger domains that are common to all fungal Zap1 functional homologs described to date [4,16,17]. Third, Zap1 is associated with the regulation of zinc transporter expression because in *C. gattii* *ZAP1* null mutants, the relative transcript levels of genes encoding the ZIP family transporters are drastically reduced

compared to WT cells. Fourth, the growth of the *C. gattii* *zap1Δ* strain is reduced in zinc-limiting conditions. Additionally, *C. gattii* null mutants for the *ZAP1* gene display attenuated virulence in the intranasal murine model of cryptococcosis, and these mutants associate more with macrophages than do WT and complemented strains in phagocytosis assays. The modulation of virulence was also demonstrated for mutants of the *ZAP1* homolog in *A. fumigatus* (*ZafA* gene) [16], further indicating the importance of zinc homeostasis in the virulence of fungal pathogens.

At least three transcription factors that regulate metal homeostasis were described in the phylogenetically related yeast *C. neoformans*. The *CIR1* and *HAPx* genes are involved in the regulation of iron homeostasis [39,40], and *CUF1* regulates copper metabolism in *C. neoformans* [28]. Lack of *CIR1* in *C. neoformans* yields cells with enhanced melanization, decreased capsule size, and temperature-sensitive growth [40], while *C. neoformans* *CUF1* null mutants are hypomelanized [28]. The *CUF1* and *CIR1* mutant phenotypes contribute to their reduced virulence, as assayed by murine models of cryptococcosis [28,40]. The analyses presented here demonstrate that *C. gattii* *ZAP1* null mutants also display reduced virulence in the same animal models and that this phenotype could not be associated with any detectable alteration in the classical virulence traits, such as melanin and capsule formation and host temperature growth. The results observed with *C. gattii* *ZAP1* are in agreement with those described for *C. neoformans*, in which the lack of *ZAP1* leads to a severe defect in murine infectivity and reduced melanization [41]. A recent report evaluated the phenotypes associated with the knockout of distinct genes encoding functional homologs belonging to distinct functional classes in both *C. neoformans* and *C. gattii*. Despite conservation in phenotypes concerning the predicted activity of the encoded protein, subtle differences could be found when compared to the classical virulence traits among the species [22]. It is therefore reasonable to assume that the decrease in virulence of *C. gattii* *ZAP1* mutants can be attributed to defects in their ability to grow in low-zinc conditions and to take up zinc from the environment. Indeed, the reduction in zinc availability in the infection milieu is a host strategy designed to hamper pathogen replication [11]. For instance, a decrease in cytoplasmic zinc concentration is observed in murine macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* or treated with cytokines that induce antimicrobial activity [42]. It has also been reported that abscesses resulting from infection with the bacterium *Staphylococcus aureus* are rich in the SB100 zinc-binding protein calprotectin, leading to zinc chelation and thereby reducing zinc availability to the pathogen [12]. Furthermore, the exposure of *C. neoformans* cells to calprotectin leads to growth inhibition and cell death [29]. Altogether, these data reinforce the dependence of *C. neoformans* and *C. gattii* on zinc availability for development within the host milieu.

We observed that *C. gattii* *ZAP1* mutant cells display several defects in their ability to handle oxidative stress. In addition to the accumulation of intracellular ROS, such cells display alterations in glutathione metabolism. For instance, *C. gattii* *ZAP1* mutant cells display increased *GPX2* transcript levels and are more sensitive to diethyl malate compared to WT cells. This suggests a decreased concentration of intracellular glutathione in *C. gattii* *ZAP1* mutant cells. In light of these results, we hypothesize that as an adaptive response to the zinc deprivation-induced accumulation of intracellular ROS levels, *C. gattii* *ZAP1* mutant cells modulate the ROS balance through glutathione metabolism. Via the activity of GPx, cells can detoxify ROS with the concomitant consumption of glutathione [35]. Accordingly, *GPX* null mutants of *C. neoformans* are hypersensitive to oxidative stress [43]. It is well documented

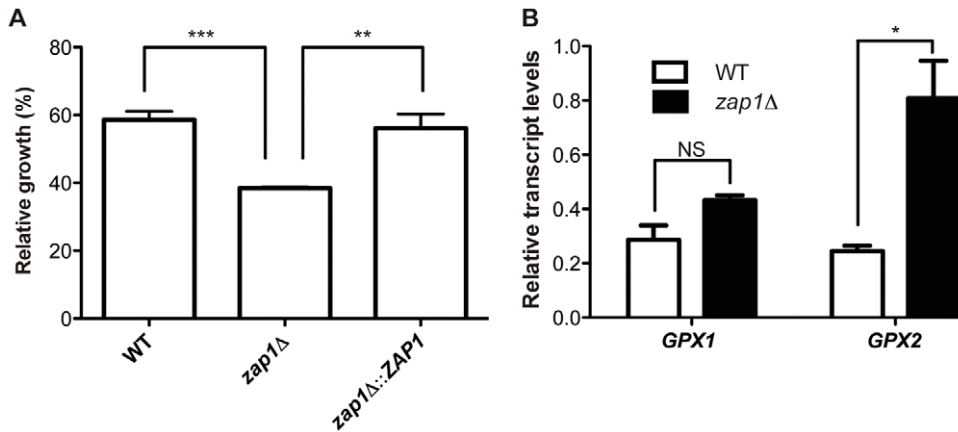


Figure 4. Lack of *ZAP1* leads to alterations in glutathione metabolism. (A) The WT, *zap1Δ* mutant and *zap1Δ::ZAP1* complemented strains were incubated in YNB or YNB +0.5 mM DEM. After 24 h of incubation, the cell density was spectrophotometrically determined. The ratio between growth in DEM and control conditions is shown as the mean \pm SD from three biological replicates. (B) Quantitative real time RT-PCR of *GPX* gene transcripts after growth of *C. gattii* WT or *zap1Δ* mutant cells in YNB + TPEN. The measured quantity of the mRNA in each of the samples was normalized using the Ct values obtained for the actin gene. Data are shown as the mean \pm SD from three experimental replicates of three biological replicates. * P <0.05. ** P <0.01. *** P <0.001. NS, not significant. doi:10.1371/journal.pone.0043773.g004

that zinc depletion results in enhanced ROS levels inside *S. cerevisiae* cells [32,44]. As an adaptive response to elevated ROS levels caused by zinc deprivation, *S. cerevisiae* cells activate the expression of the *TSA1* gene, which encodes a peroxiredoxin, to degrade hydroperoxides [44]. The *ZAP1* gene from *S. cerevisiae* is also involved in the regulation of the catalase encoding gene *CTT1* in low-zinc conditions, suggesting that this enzyme plays a role in ROS detoxification under conditions of zinc deprivation [31]. The uptake and metabolism of sulfate is largely dependent upon *ZAP1* activity in *S. cerevisiae* and is repressed in zinc-limiting conditions [33]. Methionine, cysteine, and (most likely) other metabolites from sulfur metabolism, including glutathione, are found at lower concentrations in zinc-limited *S. cerevisiae* cells, suggesting that the

detoxification of ROS in zinc-limiting conditions also relies on proper glutathione metabolism [32]. Altogether, these findings suggest that *C. gattii* likely evolved a *Zap1*-independent strategy to cope with the elevated ROS levels caused by zinc-limiting conditions, unlike those observed in *S. cerevisiae*.

The generation of RNS is a common strategy used by immune cells to hamper the development of *C. neoformans* and other fungi [45]. The successful growth and virulence of *C. neoformans* in nitrosative conditions, both *in vitro* and *in vivo*, depends on the activity of flavohemoglobin denitrosylase and S-nitrosoglutathione reductase, which are encoded by the *FHB1* and *GNO1* genes, respectively [46,47]. *C. gattii* *ZAP1* null mutants are more sensitive to the RNS generator DETA-NONOate, possibly as a consequence of reduced transcript levels of the *FBH1* ortholog in *C. gattii*, as observed in our transcriptome analysis. Therefore, in addition to defects in zinc transport and metabolism, the attenuated virulence observed in the *C. gattii* *ZAP1* null mutants may also be associated with defects in dealing with nitrosative stress.

The comparison of the *C. gattii* *ZAP1* regulon with its counterparts from *S. cerevisiae* and *C. albicans* revealed some overlapping circuits. The ZIP family of zinc transporters is positively regulated by *ZAP1* in yeasts [18,31]. However, *Zap1* regulates several other genes that are not necessarily associated with zinc homeostasis. When specifically analyzing the zinc-binding proteins, as inferred from their GO annotations, we observed that *Zap1* is a negative regulator of several zinc-binding proteins. The results presented here show that some alcohol dehydrogenases are downregulated in WT cells compared to the *ZAP1* null mutants. The same expression pattern is also observed in *S. cerevisiae* and *C. albicans* [18,31]. This strategy could represent an adaptation to low zinc availability named “zinc conservation” [32], in which other metalloproteins necessary to survive in such conditions are preferentially associated with zinc. Alcohol dehydrogenases are among the most abundant zinc-binding proteins in the cell, representing a significant proportion of the total cellular zinc [32]. As a result, the reduced expression of some zinc-binding proteins would make zinc available for other proteins, such as Cu/

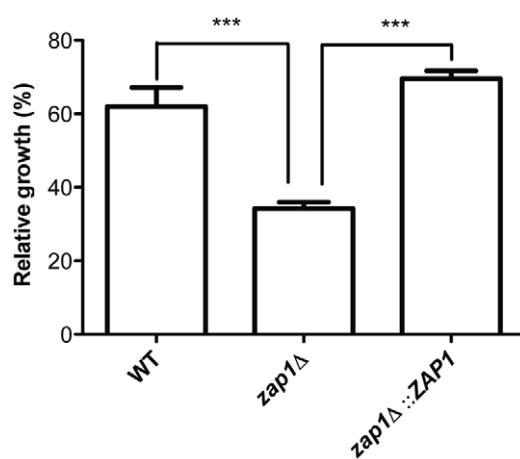


Figure 5. *C. gattii* *ZAP1* gene null mutant shows defects in the response to RNS. The WT, *zap1Δ* mutant and *zap1Δ::ZAP1* complemented strains were incubated in YNB or YNB +1 mM DETA-NONOate. After 24 h of incubation, the cell density was spectrophotometrically determined. The ratio between growth in DEM and control conditions is shown as the mean \pm SD from three biological replicates. *** P <0.001. doi:10.1371/journal.pone.0043773.g005

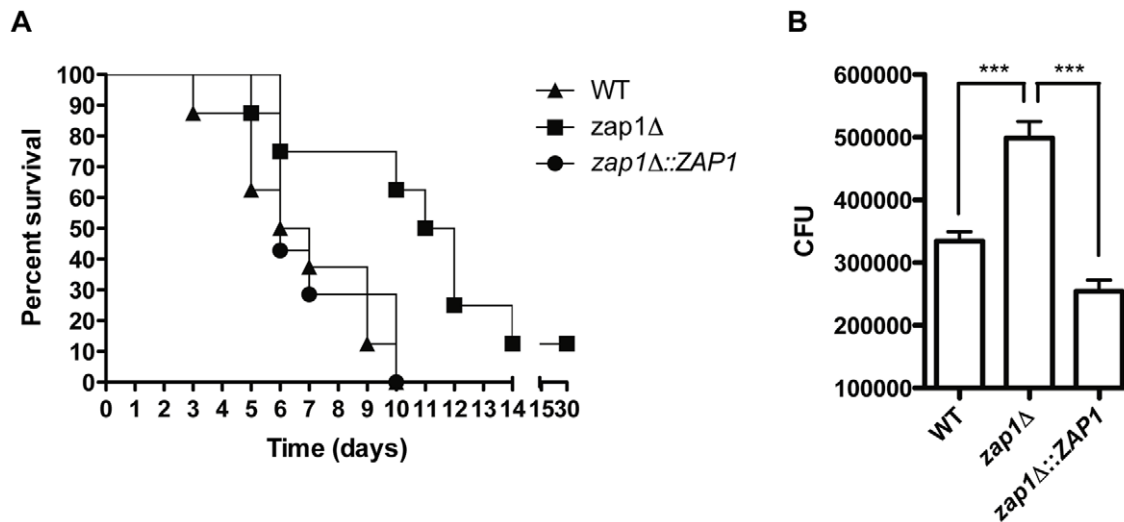


Figure 6. Zap1 is required for full *C. gattii* virulence in mice and influences phagocytosis by macrophages. (A) Virulence assay of WT, *zap1Δ* mutant and *zap1Δ::ZAP1* complemented strains in an intranasal inhalation infection model with BALB/c mice. (B) CFU counts after macrophage infection with WT, *zap1Δ* mutant and *zap1Δ::ZAP1* complemented strains. *** $P < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0043773.g006

Zn SODs, as a strategy to cope with the harsh conditions of a zinc-limiting milieu.

In conclusion, this report describes the identification and characterization of Zap1, a general regulator of zinc homeostasis in *C. gattii*. Two key events are responsible for the observed reduced virulence of *C. gattii* *ZAP1* null mutants in the intranasal murine model of infection: the reduced zinc load in cells and the corresponding increase in intracellular ROS. The *C. gattii* Zap1 regulon includes zinc transporters and several zinc-binding proteins, and there is some conservation between it and the regulatory circuits of other yeast Zap1 regulons.

Materials and Methods

Ethics statement

The use of animals in this work were performed with approval of The Universidade Federal do Rio Grande do Sul Ethics Committee for Use of Animals (CEUA – protocol number 19801). Mice were housed in groups of four in kept in filtered top ventilated cages, maintained on 12 h dark/light cycle, with food and water *ad libitum*. The animals were cared according to the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONSEA) and Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) guidelines. All efforts to minimize animal suffering were made. Before mortality analysis, mice were intraperitoneally anesthetized with 100 mg/kg Ketamine and 16 mg/kg Xylazine. Mice were analyzed twice daily for any signals of suffering, defined by weight loss, weakness or inability to obtain feed or water. In the first signals of suffering, mice were humanely sacrificed.

Strains and culture conditions

The *C. gattii* strain R265 was used in this work. It was routinely cultured in YPD (2% glucose, 2% peptone, and 1% yeast extract). Agar was added to a final concentration of 1.5% when solid media was used. YPD plates supplemented with 100 μ g/ml nourseothricin were used to select for the *C. gattii* *zap1Δ* mutant strain. YPD +200 μ g/ml hygromycin was used to select for the *C. gattii* *zap1Δ::ZAP1* complemented strain. Phenotypic assays were

conducted in Yeast Nitrogen Base (YNB, without amino acids and ammonium sulfate) with the addition of asparagine to a final concentration of 40 mM. The murine macrophage-like cell line was used for the evaluation of phagocytosis-related phenotypes. It was routinely cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂.

In silico identification and characterization of *C. gattii* ZAP1

The putative *C. gattii* *ZAP1* gene was identified by BLAST analysis of the Broad Institute *C. gattii* R265 database using the *S. cerevisiae* Zap1p sequence as a query (NCBI accession number NP_012479.1). Amino acid sequences of Zap1 orthologs from *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *A. fumigatus*, *C. gattii* and *C. neoformans* were aligned using ClustalX2 [48]. Mega5 was utilized for phylogenetic analysis applying the Neighbor-Joining method; tree architecture was inferred using 1000 bootstraps [49]. Searches for zinc-binding domains were conducted using the ScanProsite tool [50].

Construction of knockout and complemented *C. gattii* ZAP1 strains

The Delsgate methodology was used to construct the *ZAP1* gene inactivation allele by employing the vector pDONR-NAT, as previously described for *C. neoformans* [51,52]. The nourseothricin resistance cassette from pAI4 was subcloned into the *EcoRV* site of pDONR201 (Gateway donor vector, Invitrogen) to construct plasmid pDONR-NAT. The 5' and 3' *ZAP1* flanking sequences (953 and 801 bp, respectively) were PCR-amplified and gel purified (Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit, GE Healthcare). The plasmid pDONR-NAT and each PCR product were mixed at equimolar ratios in a BP clonase reaction according to 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 [53]. For complementation, a 5-kb fragment spanning the *ZAP1* gene was amplified from *C. gattii* R265 DNA and subcloned into the *EcoRV*

Table 1. List of selected *ZAP1*-regulated genes in *C. gattii*.

Category/ Accession ^A	Description ^A	PFAM ^A	Fold Change ^B
Transport			
CNBG_2209	zrt1 protein	ZIP zinc/iron transport family	6.96
CNBG_6066	zinc ion transporter	ZIP zinc/iron transport family	6.42
CNBG_4611	sodium: inorganic phosphate symporter	Phosphate transporter family	2.05
Oxidative metabolism			
CNBG_3964	flavohemoglobin	Oxidoreductase NAD-binding domain	2.24
Sulfate metabolism			
CNBG_1788	glutathione S-transferase	Mak16 protein	2.08
CNBG_6075	S-adenosylhomocysteine hydrolase	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	2.00
CNBG_6043	glutathione transferase	N/A	-1.87
CNBG_1291	cystathionine beta-synthase	Pyridoxal-phosphate dependent enzyme	-4.34
Zinc-binding^C			
CNBG_1642	transcription factor IIIb	TFIIB zinc-binding; Brf1-like TBP-binding domain	3.67
CNBG_2093	RNA polymerase III smallest subunit	Transcription factor S-II (TFIIS)	1.87
CNBG_3335	DNA-directed RNA polymerase I polypeptide	Transcription factor S-II (TFIIS)	2.10
CNBG_0427	conserved hypothetical protein	Zinc-binding dehydrogenase	-2.21
CNBG_1120	conserved hypothetical protein	Putative GTPase activating protein for Arf	-2.00
CNBG_1321	cytoplasm protein	Zinc-binding dehydrogenase	-0.62
CNBG_2992	alcohol dehydrogenase	Alcohol dehydrogenase GroES-like domain	-0.81
CNBG_3576	quinone oxidoreductase	Alcohol dehydrogenase GroES-like domain	-2.00
CNBG_3878	zinc-binding dehydrogenase	Alcohol dehydrogenase GroES-like domain	-2.73
CNBG_3919	xylitol dehydrogenase	Alcohol dehydrogenase GroES-like domain	-2.48
CNBG_4844	conserved hypothetical protein	Fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain	-1.59
CNBG_4875	R,R-butanediol dehydrogenase	Alcohol dehydrogenase GroES-like domain;	-2.67
CNBG_5308	conserved hypothetical protein	Zinc finger, ZZ type	-1.81
CNBG_5559	conserved hypothetical protein	LIM domain	-1.80
CNBG_6001	extracellular elastinolytic metalloproteinase	Fungalsin metalloproteinase (M36);	-2.70
CNBG_6010	mannose-6-phosphate isomerase	Phosphomannose isomerase type I	-2.41

A: Gene accessions, descriptions and PFAM descriptions were obtained from the Broad Institute Database.

B: Data are presented as the ratio of FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped) of genes in WT cells compared to their expression in *ZAP1* mutant cells during growth in YNB + TPEN using a log scale.

C: Zinc-binding proteins were selected based on UFO analysis [37] using the predicted protein sequences of significantly differentially expressed genes in the WT or *zap1Δ* strains as input. The sequences that contained the GO term "zinc ion binding" (GO:0008270) were selected for further functional classification.

doi:10.1371/journal.pone.0043773.t001

site of pJAF15, and the plasmid was transformed into the *C. gattii zap1Δ* strain. Correct integration of the inactivation cassette into the WT *ZAP1* locus was evaluated by Southern blot and RT-PCR analysis. The primers used in these constructions are listed in Table S2.

Phenotypic assays

The viability of mutant cells in zinc-limiting media was assessed by pre-growing the WT, *zap1Δ* and *zap1Δ::ZAP1* strains in YPD overnight (30°C). The cells were then washed with water and 1×10^6 cells were inoculated in YNB containing 10 μM TPEN or YNB containing 10 μM TPEN and 10 μM ZnCl₂. After 24 h of incubation at 30°C, the OD₆₀₀ was determined. To evaluate the viability of cells when exposed to other chemicals, the cells were washed after the YPD incubation, and 1×10^6 cells were inoculated in YNB with various concentrations of diethyl malate or DETA-NONOate. After 24 h of incubation at 30°C, the OD₆₀₀ was determined. Capsule formation was examined by microscopy after incubation for 24 h (37°C and 5 % CO₂) in DMEM media with

10 % FBS that was prepared 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. Niger seed medium plates were used for melanin synthesis evaluation.

RNA-seq analysis

WT and *zap1Δ* cells were pre-grown in YPD media (30°C for 24 h) and then inoculated in YNB media for a further period of growth (30°C for 18 h). YNB + 10 μM TPEN was inoculated with 1×10^7 cells/mL and incubated for additional 4 h at 30°C. Cells were collected by centrifugation (10,000 g for 10 min), and RNA was isolated by Trizol (Invitrogen) after cellular lysis via mortar and pestle. RNA integrity and concentration were assessed by electrophoresis on a 1% agarose gel and by fluorometry analysis using a Qubit fluorometer and a Quant-iT RNA assay kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). mRNA was purified from total RNA samples, processed and sequenced using Solexa technology on an Illumina Genome Analyzer GAI

(Fasteris Life Sciences SA, Plan-les-Ouates, Switzerland). The resulting fastq files were aligned to the *C. gattii* R265 reference sequence [30] with the help of Tophat [54]. Aligned transcripts were quantified using cufflinks [55] with the current annotation of the *C. gattii* R265 genome provided by the Broad Institute. Differential expression was evaluated by the cuffdiff module of cufflinks with a False Discovery Rate (FDR) set at 5%. Genes with an FDR corrected p-value <0.05 were considered to be statistically significant. Functional classification against PFAM and GO of differentially expressed genes was performed using the web server UFO [37].

Real time RT-PCR analysis

RNA samples were prepared as above. cDNAs were prepared from DNase (Promega)-treated total RNA samples (500 ng) with ImProm-II Reverse transcriptase (Promega) using oligo-dT. qRT-PCR was performed on a Real-time PCR StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with thermal cycling conditions set with an initial step at 95°C for 5 min followed by 40 cycles at 95°C for 15 s, 55°C for 15 s and 60°C for 60 s. Platinum SYBR green qPCR Supermix (Invitrogen) was used as a reaction mix, supplemented with 5 pmol of each primer and 1 µl of the cDNA template in a final volume of 25 µl. All experiments were performed using three independent cultures, and each cDNA sample was analyzed in triplicate with 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 to actin cDNAs amplified in each set of PCR experiments. Relative expression was determined by the $2^{-\Delta CT}$ method [56]. Statistical analyses were conducted via a two-tailed Student's t-test. The primers used in these analyses are listed in Table S2.

ROS measurement.

Cells were grown overnight in YPD medium at 30°C, washed in YNB and incubated for an additional 24 h in YNB. Cells were washed and inoculated at a cell density of 1×10^7 cells/mL in fresh YNB +10 µM TPEN. The acetoxymethyl ester of dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA) (Molecular Probes) was added to a final concentration of 10 µM and incubated for an additional 2 h to load the dye into cells. After 2 h, the cells were washed with PBS and analyzed for fluorescence determination using a SpectraMax M4 plate reader fluorometer (Molecular Devices) with the emission and excitation wavelengths set at 488 and 520 nm, respectively. Fluorescence values were normalized to cell count, based on the OD₆₀₀ determination. Statistical analyses were conducted with a two-tailed Student's t-test.

Intracellular zinc level determinations

Cells were cultivated for ROS assessment. After a 24-h incubation in YNB, cells were washed and inoculated at a density of 1×10^7 cells/mL in fresh YNB. The acetoxymethyl ester of Fluozin-1 (Fluozin-1 AM – Molecular Probes) was added to a final concentration of 10 µM and incubated for an additional 2 h to load the dye into the cells. A control experiment was conducted in which TPEN was included to evaluate the fluorescence background. After 2 h, the cells were washed with PBS and analyzed for fluorescence determination in a SpectraMax M4 plate reader fluorometer (Molecular Devices) with its emission and excitation wavelengths set to 495 and 517 nm, respectively. Fluorescence values were normalized to the cell count, as determined by OD₆₀₀ measurement. Statistical analyses were conducted using a two-tailed Student's t-test.

Macrophage assays

Phagocytosis assays were conducted to evaluate the susceptibility of WT, *zap1Δ* and *zap1Δ::ZAP1* cells to the antifungal action of phagocytes. Macrophage-like RAW264.7 cells were seeded at a density of 1×10^5 cells/100 µl of DMEM supplemented with 10% FBS in each well of the 96-well culture plates (TPP). After 24 h of incubation (37°C and 5% CO₂), the medium was replaced with fresh medium containing 1×10^6 cells of each fungal strain, obtained after a 24-h incubation in YPD and extensive washing in PBS. The plates were further incubated (18 h, 37°C, and 5% CO₂), and yeast cells that were not associated with the macrophages were removed by PBS washes. Fungal survival was evaluated after macrophage lysis with sterile ice-cold Milli-Q water and subsequent plating on YPD for CFU determination. This assay was performed in triplicate for each strain. A Student's t-test was used to determine the statistical significance of the observed differences in fungal survival.

Survival assays

Virulence studies were conducted as previously described [51]. Briefly, fungal cells were cultured in 50 ml YPD medium at 30°C overnight with shaking, washed twice and re-suspended in PBS. Groups of eight female BALB/c mice (approximately 5 weeks old) intraperitoneally anesthetized with 100 mg/kg Ketamine and 16 mg/kg Xylazine were infected with 1×10^7 yeast cells suspended in 50 µl PBS and monitored twice daily for moribund signals. We used a high *C. gattii* inoculum since BALB/c mouse is moderately resistant to cryptococcal infection [57]. The median survival values were calculated by Kaplan–Meier survival analysis. Animal studies were approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Ethics Committee.

Supporting Information

Figure S1 *In silico* characterization of *C. gattii* Zap1. Multiple sequence alignment of the Zap1 ortholog sequences of *C. neoformans* serotype D Zap1 (CryneoD_Zap1 – Genbank XP_572252) and *C. neoformans* serotype A Zap1 (CryneoA_Zap1 – Broad Institute CNAG_05392) with the *C. gattii* Zap1 Broad Institute (A) and the proposed sequences (B). The predicted zinc fingers are shown as shaded black boxes. (C) Comparison of the CNBG_4460 locus (Supercontig 11: 588643–591042) automatic annotation and the proposed annotation with the annotated sequences of *ZAP1* from *C. neoformans* serotype D (CryneoD_*ZAP1* – Genbank NC_006693) and *C. neoformans* serotype A (CryneoA_*ZAP1* – Broad Institute CNAG_05392). Exons are depicted with arrows and arrowheads. (TIF)

Figure S2 Construction of the *C. gattii* ZAP1 gene knockout and complemented strains. A. *ZAP1* deletion scheme. TV represents the targeting vector constructed by Delsgate methodology. 5 ZAP1 and 3 ZAP1 represent the 5' and 3' flanking regions of the *ZAP1* gene, respectively. 5F and 5R: primers utilized to amplify the 5' flanking region of *ZAP1*. 3F and 3R: primers utilized to amplify the 3' flanking region of *ZAP1*. Nat: cassette that confers nourseothricin resistance. WT represents the wild type locus of the *ZAP1* gene in the R265 strain. Δ represents the *ZAP1* locus in the *zap1* mutant strain. The cleavage sites of the *Bgl*III restriction enzyme are indicated. B. Confirmation by Southern blotting. Genomic DNA (10 µg) from WT (lane 1), *zap1Δ::ZAP1* complemented (lane 2) and *zap1Δ* mutant (lane 3) strains was digested with *Bgl*III. The 3' flanking region was used as the probe for Southern hybridization. Numbers on the left indicate the hybridization signal sizes based upon the position of the

molecular size marker. C. Semi-quantitative RT-PCR using cDNA from WT, *zap1Δ* mutant and *zap1Δ::ZAP1* complemented strains as the template. RNA samples were used as templates for reactions employing (+) reverse transcriptase. Control reactions without reverse transcriptase addition (–) were used to confirm the absence of genomic DNA. The upper panel shows the *ZAP1* amplicons, while the lower panel shows the *ACT1* amplicons (loading control). (TIF)

Figure S3 Analysis of virulence-related phenotypes of the *C. gattii* *ZAP1* null mutant. (A) Melanin production was assessed by plating ten-fold serial dilutions of WT, *zap1Δ* mutant and *zap1Δ::ZAP1* complemented strains in niger seed agar and incubating for 48 h. (B) Ability to replicate at body temperature was assessed by plating ten-fold serial dilutions of WT, *zap1Δ* mutant and *zap1Δ::ZAP1* complemented strains in YNB agar and incubating at 30 or 37°C for 24 h. (C) Capsule production was evaluated by analysis of the capsule/cell ratio of 100 distinct cells from WT, *zap1Δ* mutant and *zap1Δ::ZAP1* cells cultured in capsule-inducing conditions. (TIF)

References

- Ehrensberger KM, Bird AJ (2011) Hammering out details: regulating metal levels in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 36: 524–531.
- Eide DJ (1998) The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Nutr* 18: 441–469.
- Zhao H, Eide D (1996) The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2454–2458.
- Zhao H, Eide DJ (1997) Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17: 5044–5052.
- Waters BM, Eide DJ (2002) Combinatorial control of yeast FET4 gene expression by iron, zinc, and oxygen. *J Biol Chem* 277: 33749–33757.
- Kamizono A, Nishizawa M, Teranishi Y, Murata K, Kimura A (1989) Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 219: 161–167.
- MacDiarmid CW, Gaither LA, Eide D (2000) Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 19: 2845–2855.
- Li L, Kaplan J (2001) The yeast gene MSC2, a member of the cation diffusion facilitator family, affects the cellular distribution of zinc. *J Biol Chem* 276: 5036–5043.
- Eide DJ (2003) Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Nutr* 133: 1532S–1535S.
- Lyons TJ, Gasch AP, Gaither LA, Botstein D, Brown PO, et al. (2000) Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7957–7962.
- Kehl-Fie TE, Skaar EP (2010) Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Current Opinion in Chemical Biology* 14: 218–224.
- Corbin BD, Seeley EH, Raab A, Feldmann J, Miller MR, et al. (2008) Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science* 319: 962–965.
- Kehl-Fie TE, Chitayat S, Hood MI, Damo S, Restrepo N, et al. (2011) Nutrient metal sequestration by calprotectin inhibits bacterial superoxide defense, enhancing neutrophil killing of *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe* 10: 158–164.
- Howard DH (1999) Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev* 12: 394–404.
- Jung WH, Kronstad JW (2008) Iron and fungal pathogenesis: a case study with *Cryptococcus neoformans*. *Cell Microbiol* 10: 277–284.
- Moreno MA, Ibrahim-Granet O, Vicentefranqueira R, Amich J, Ave P, et al. (2007) The regulation of zinc homeostasis by the ZafA transcriptional activator is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Mol Microbiol* 64: 1182–1197.
- Kim MJ, Kil M, Jung JH, Kim J (2008) Roles of Zinc-responsive transcription factor Csr1 in filamentous growth of the pathogenic Yeast *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol* 18: 242–247.
- Nobile CJ, Nett JE, Hernday AD, Homann OR, Deneault JS, et al. (2009) Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. *PLoS Biol* 7: e1000133.
- Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP (2009) Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 513–521.
- Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, et al. (2009) Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23: 525–530.
- Lin X (2009) *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infect Genet Evol* 9: 401–416.
- Chaturvedi V, Chaturvedi S (2011) *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. *Trends Microbiol* 19: 564–571.
- Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, et al. (2004) A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 17258–17263.
- Byrnes EJ, Heitman J (2009) *Cryptococcus gattii* outbreak expands into the Northwestern United States with fatal consequences. *F1000 Biol Rep* 1.
- Byrnes EJ, 3rd, Li W, Lewit Y, Perfect JR, Carter DA, et al. (2009) First reported case of *Cryptococcus gattii* in the Southeastern USA: implications for travel-associated acquisition of an emerging pathogen. *Plos One* 4: e5851.
- Ma H, May RC (2009) Virulence in *Cryptococcus* species. *Adv Appl Microbiol* 67: 131–190.
- Ding C, Yin J, Tovar EM, Fitzpatrick DA, Higgins DG, et al. (2011) The copper regulon of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* H99. *Mol Microbiol* 81: 1560–1576.
- Waterman SR, Hacham M, Hu G, Zhu X, Park YD, et al. (2007) Role of a CUF1/CTR4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest* 117: 794–802.
- Mambula SS, Simons ER, Hastey R, Selsted ME, Levitz SM (2000) Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 68: 6257–6264.
- Cryptococcus gattii* Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT – Broad Institute website. Available: http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans_b/MultiHome.html. Accessed 2012 Jul 28.
- Wu CY, Bird AJ, Chung LM, Newton MA, Winge DR, et al. (2008) Differential control of Zap1-regulated genes in response to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* 9: 370.
- Eide DJ (2009) Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 284: 18565–18569.
- Wu CY, Roje S, Sandoval FJ, Bird AJ, Winge DR, et al. (2009) Repression of Sulfate Assimilation Is an Adaptive Response of Yeast to the Oxidative Stress of Zinc Deficiency. *Journal of Biological Chemistry* 284: 27544–27556.
- Perrone GG, Grant CM, Dawes IW (2005) Genetic and environmental factors influencing glutathione homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 16: 218–230.
- Flohe L, Toppo S, Cozza G, Ursini F (2011) A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxid Redox Signal* 15: 763–780.
- Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, et al. (2011) Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol* 9: 193–203.
- Meinicke P (2009) UFO: a web server for ultra-fast functional profiling of whole genome protein sequences. *BMC Genomics* 10: 409.
- Maret W (2010) Metalloproteomics, metalloproteomes, and the annotation of metalloproteins. *Metallomics* 2: 117–125.
- Jung WH, Saikia S, Hu G, Wang J, Fung CK, et al. (2010) HapX positively and negatively regulates the transcriptional response to iron deprivation in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog* 6: e1001209.

Table S1 Complete list of Zap1-regulated genes with at least 2-fold differential expression.

(XLSX)

Table S2 List of primers used in this work.

(DOCX)

Acknowledgments

The authors thank Dr. Joseph Heitman and Dr. Alex Idnurm for providing the pJAF15 and pAI4 plasmids. The authors also thank Dr. Marcio L. Rodrigues for his critical reading of the manuscript. Automated DNA sequencing was performed at the facilities of the Brazilian Genome Network at the Center of Biotechnology, CBIOT-UFRGS-RS. The authors declare no conflict of interest.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ROS NSSF LK AS MHV CCS. Performed the experiments: ROS NSSF LK. Analyzed the data: ROS NSSF LK CCS. Contributed reagents/materials/analysis tools: AS MHV CCS. Wrote the paper: ROS CCS.

40. Jung WH, Sham A, White R, Kronstad JW (2006) Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biol* 4: e110.
41. Liu OW, Chun CD, Chow ED, Chen C, Madhani HD, et al. (2008) Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Cell* 135: 174–188.
42. Winters MS, Chan Q, Caruso JA, Deepe GS, Jr. (2010) Metallomic analysis of macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* reveals a fundamental role for zinc in host defenses. *J Infect Dis* 202: 1136–1145.
43. Missall TA, Cherry-Harris JF, Lodge JK (2005) Two glutathione peroxidases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* are expressed in the presence of specific substrates. *Microbiology* 151: 2573–2581.
44. Wu CY, Bird AJ, Winge DR, Eide DJ (2007) Regulation of the yeast TSA1 peroxiredoxin by ZAP1 is an adaptive response to the oxidative stress of zinc deficiency. *J Biol Chem* 282: 2184–2195.
45. Gross NT, Nessa K, Cammer P, Jarstrand C (1999) Production of nitric oxide by rat alveolar macrophages stimulated by *Cryptococcus neoformans* or *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 37: 151–157.
46. de Jesus-Berrios M, Liu L, Nussbaum JC, Cox GM, Stamler JS, et al. (2003) Enzymes that counteract nitrosative stress promote fungal virulence. *Curr Biol* 13: 1963–1968.
47. Idnurm A, Reedy JL, Nussbaum JC, Heitman J (2004) *Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis. *Eukaryot Cell* 3: 420–429.
48. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.
49. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739.
50. de Castro E, Sigrist CJ, Gattiker A, Bulliard V, Langendijk-Genevaux PS, et al. (2006) ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res* 34: W362–365.
51. Kmetzsch L, Staats CC, Simon E, Fonseca FL, de Oliveira DL, et al. (2010) The vacuolar Ca²⁺(+) exchanger Vcx1 is involved in calcineurin-dependent Ca²⁺(+) tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 9: 1798–1805.
52. Kmetzsch L, Staats CC, Simon E, Fonseca FL, Oliveira DL, et al. (2011) The GATA-type transcriptional activator Gat1 regulates nitrogen uptake and metabolism in the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet Biol* 48: 192–199.
53. Toffaletti DL, Rude TH, Johnston SA, Durack DT, Perfect JR (1993) Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *J Bacteriol* 175: 1405–1411.
54. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25: 1105–1111.
55. Roberts A, Pimentel H, Trapnell C, Pachter L (2011) Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-Seq. *Bioinformatics* 27: 2325–2329.
56. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* 25: 402–408.
57. Huffnagle GB, Boyd MB, Street NE, Lipscomb MF (1998) IL-5 is required for eosinophil recruitment, crystal deposition, and mononuclear cell recruitment during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection in genetically susceptible mice (C57BL/6). *J Immunol* 160: 2393–2400.

A		B	
CryneoD	MYQQQTMAHSPFFSHNNPWARSACCDQHHGESTSAAMARLAGNIPFSDENLHDHHLGY 60	CryneoD	MYQQQTMAHSPFFSHNNPWARSACCDQHHGESTSAAMARLAGNIPFSDENLHDHHLGY 60
CryneoA	MYQQQTMAHSPFFSHNNPWARSACCDQHHGESTSAATARLAGNIPSSHQNLHDHHLGY 60	CryneoA	MYQQQTMAHSPFFSHNNPWARSACCDQHHGESTSAATARLAGNIPSSHQNLHDHHLGY 60
Crygat	-----MANHPCFSSHNNPWARSACCDQHHGESTSAATARLAGNIPVSHDQNIHNRHLEY 54	Crygat	-----MANHPCFSSHNNPWARSACCDQHHGESTSAATARLAGNIPVSHDQNIHNRHLEY 54
CryneoD	HDSSGCTSDCPLDLYCCSGDYCCDKHGSCSSGDECCDDPRCEEAHRPDSRASHQSHHNR 120	CryneoD	HDSSGCTSDCPLDLYCCSGDYCCDKHGSCSSGDECCDDPRCEEAHRPDSRASHQSHHNR 120
CryneoA	HDSSGCTSDCPLDLYCCSGDYCCDKHGSCSSGDECCDDPRCEEAHRPDSRTSHPSRSHLS 120	CryneoA	HDSSGCTSDCPLDLYCCSGDYCCDKHGSCSSGDECCDDPRCEEAHRPDSRTSHPSRSHLS 120
Crygat	HDPSACNSECLDLYCCSGDYCCDKHGSCSSGDECCDNPSCEEAQRPSRASHSHRSHS 114	Crygat	HDPSACNSECLDLYCCSGDYCCDKHGSCSSGDECCDNPSCEEAQRPSRASHSHRSHS 114
CryneoD	KPEQSRNHHQQPMSLEEWAGTQEGCNAIQQLIECCNQPDCHIPVCPTDSEVHPFPADP 180	CryneoD	KPEQSRNHHQQPMSLEEWAGTQEGCNAIQQLIECCNQPDCHIPVCPTDSEVHPFPADP 180
CryneoA	KPEQSRNQQSHQQPMSLEEWAGTQEGCNAIQQLIECCNQPDCHIPVCPTDSEVHPFPADP 180	CryneoA	KPEQSRNQQSHQQPMSLEEWAGTQEGCNAIQQLIECCNQPDCHIPVCPTDSEVHPFPADP 180
Crygat	KTEQSHNRSHQQPMSLEEWAVTQEGCDAIQQLIECCNQPDCHIPVCPTDSEVHPFPADP 174	Crygat	KTEQSHNRSHQQPMSLEEWAVTQEGCDAIQQLIECCNQPDCHIPVCPTDSEVHPFPADP 174
CryneoD	LSALFASLDAQQPPISTAQQPMAPVSSVEASHTCHWGNCHLVFGSMPDLLAHVAADHL 240	CryneoD	LSALFASLDAQQPPISTAQQPMAPVSSVEASHTCHWGNCHLVFGSMPDLLAHVAADHL 240
CryneoA	LSALFASLDAPQQPPISTAQQPMVPISSVEASHTCHWGNCHLVFGSMPDLLAHVAADHL 240	CryneoA	LSALFASLDAPQQPPISTAQQPMVPISSVEASHTCHWGNCHLVFGSMPDLLAHVAADHL 240
Crygatv	LSALFASLDTQQQPPISTAQQPMAPVSSIEASHTCHWGNCHLVFGSMPDLLAHVAADHL 234	Crygat	LSALFASLDTQQQPPISTAQQPMAPVSSIEASHTCHWGNCHLVFGSMPDLLAHVAADHL 234
CryneoD	NAAGTAHQSDQLLQQAQSAQSAQSTPLALLTERALSSISTNTTGLQSHLPTNSSLQATS 300	CryneoD	NAAGTAHQSDQLLQQAQSAQSAQSTPLALLTERALSSISTNTTGLQSHLPTNSSLQATS 300
CryneoA	NAAGTAHQSDQLLQQAQSSQ---PTPLTMLTERALPSISTNTTSLQNNLQTNSSLQAASL 297	CryneoA	NAAGTAHQSDQLLQQAQSSQ---PTPLTMLTERALPSISTNTTSLQNNLQTNSSLQAASL 297
Crygat	NAAGTAHQSDQLLQQPNAQ---PTPLTMLTQRVLPISISTSTGLQNNLQINSSLQVTS 291	Crygat	NAAGTAHQSDQLLQQPNAQ---PTPLTMLTQRVLPISISTSTGLQNNLQINSSLQVTS 291
CryneoD	AVNDALLSCMWDCFPVPEVFAASSTSHSTFHHYNSDNCQAPHNHQHDHSAAGEPFNPG 360	CryneoD	AVNDALLSCMWDCFPVPEVFAASSTSHSTFHHYNSDNCQAPHNHQHDHSAAGEPFNPG 360
CryneoA	AVNDALLSCMWDCFPVPEVFAASSTSHSMFHHYNSDNCQASHNHQHDHTYAAGEFPSPG 357	CryneoA	AVNDALLSCMWDCFPVPEVFAASSTSHSMFHHYNSDNCQASHNHQHDHTYAAGEFPSPG 357
Crygat	AVNDALLSCMWDCFPVPEVFAASSTSHMFMHQYNSSESAAHNQHDHTNAAGEFPSPG 351	Crygat	AVNDALLSCMWDCFPVPEVFAASSTSHMFMHQYNSSESAAHNQHDHTNAAGEFPSPG 351
CryneoD	TMLRHVLEEHLGIPDDIIGWFNEAELQAQAQAILEKHHHHHHIDPREALVNHSENCNVH 420	CryneoD	TMLRHVLEEHLGIPDDIIGWFNEAELQAQAQAILEKHHHHHHIDPREALVNHSENCNVH 420
CryneoA	TMLRHVLEEHLGIPDDIIGWFNEAELQAQAQAILEKHHHHHHIDPREALVNHSENCNVH 417	CryneoA	TMLRHVLEEHLGIPDDIIGWFNEAELQAQAQAILEKHHHHHHIDPREALVNHSENCNVH 417
Crygat	TMLRHVLEEHLGIPDDIIGWFNEAELQAQAQAILEKHHHHHHIDPREALVNHSENCNVH 411	Crygat	TMLRHVLEEHLGIPDDIIGWFNEAELQAQAQAILEKHHHHHHIDPREALVNHSENCNVH 411
CryneoD	PHPHSHSHGNSACTGANDSHPHGHALAHSQFHPNLPHPHSLPHERSYAHSHLSHSRPL 480	CryneoD	PHPHSHSHGNSACTGANDSHPHGHALAHSQFHPNLPHPHSLPHERSYAHSHLSHSRPL 480
CryneoA	PHPHSHSHGNASAGANDSHPHGHALAHSQFHPNSHPHS---LHERSYAHSHLSLSRPF 474	CryneoA	PHPHSHSHGNASAGANDSHPHGHALAHSQFHPNSHPHS---LHERSYAHSHLSLSRPF 474
Crygat	PHPHSHSHSHGANAG--DSHLHGHAHSHFN--AHPYS---RERSHAHPRSLSHSRPL 463	Crygat	PHPHSHSHSHGANAG--DSHLHGHAHSHFN--AHPYS---RERSHAHPRSLSHSRPL 463
CryneoD	SHEPLTPPSTVKTEACTSPAASNDVASTVLTASQSSKDLICLWPGCTIHTPFFASTASL 540	CryneoD	SHEPLTPPSTVKTEACTSPAASNDVASTVLTASQSSKDLICLWPGCTIHTPFFASTASL 540
CryneoA	SHEPLTPPSTVKTEACTSPAASNDVIASTVLPSPQSKAFICLWPGCTIHTPFFASTASL 534	CryneoA	SHEPLTPPSTVKTEACTSPAASNDVIASTVLPSPQSKAFICLWPGCTIHTPFFASTASL 534
Crygat	SHEPLTPPSTVKTEVSTSPDAFNDSVHSTVLAAPSQAKSLICLWPGCTIHTPFADTTSL 523	Crygat	SHEPLTPPSTVKTEVSTSPDAFNDSVHSTVLAAPSQAKSLICLWPGCTIHTPFADTTSL 523
CryneoD	MDHLESMHIIKPKGDCYTCWHGGCGGEGRVRFSRQKVLRLHQSHIGHKPFVCGVNCQAFS 600	CryneoD	MDHLESMHIIKPKGDCYTCWHGGCGGEGRVRFSRQKVLRLHQSHIGHKPFVCGVNCQAFS 600
CryneoA	MDHLESMHIIKPKGDCYTCWHGGCGGKGRVFRSQRKVLRLHQSHIGHKPFVCGVNCQAFS 594	CryneoA	MDHLESMHIIKPKGDCYTCWHGGCGGKGRVFRSQRKVLRLHQSHIGHKPFVCGVNCQAFS 594
Crygat	MDHLESEVHIIKPKGDCYTCWHGGCGGEGRMRFSRQKVLRLHQSHIGHKPFVCG----- 576	Crygat	MDHLESEVHIIKPKGDCYTCWHGGCGGEGRMRFSRQKVLRLHQSHIGHKPFVCG----- 576
CryneoD	EAAPLTAHMRRAHQEKPFKCEHPGCGKSFATSSSLTHMRTHNGEKPFVPCYQKGFVEA 660	CryneoD	EAAPLTAHMRRAHQEKPFKCEHPGCGKSFATSSSLTHMRTHNGEKPFVPCYQKGFVEA 660
CryneoA	EAAPLTAHMRRAHQEKPFKCEHPGCGKSFATSSSLTHMRTHNGEKPFVPCYQKGFVEA 654	CryneoA	EAAPLTAHMRRAHQEKPFKCEHPGCGKSFATSSSLTHMRTHNGEKPFVPCYQKGFVEA 654
Crygat	-----RTHNGEKPFVPCYQKGFVEA 597	Crygat	EAAPLTAHMRRAHQEKPFKCEHPGCGKSFATSSSLTHMRTHNGEKPFVPCYQKGFVEA 643
CryneoD	SNLTKHIRTHTGERPFACSHPGCGKKSFRPDQLKRHMTIHNKPPGKRRGSGVPAK 716	CryneoD	SNLTKHIRTHTGERPFACSHPGCGKKSFRPDQLKRHMTIHNKPPGKRRGSGVPAK 716
CryneoA	SNLTKHIRTHTGERPFACSHPGCGKKSFRPDQLKRHMTIHNKPPGKRRGSGVPAK 710	CryneoA	SNLTKHIRTHTGERPFACSHPGCGKKSFRPDQLKRHMTIHNKPPGKRRGSGVPAK 710
Crygat	SNLTKHIRTHTGERPFACSHPGCGKKSFRPDQLKRHMTIHNKSAEKRKRGSGVSLK 653	Crygat	SNLTKHIRTHTGERPFACSHPGCGKKSFRPDQLKRHMTIHNKSAEKRKRGSGVSLK 699

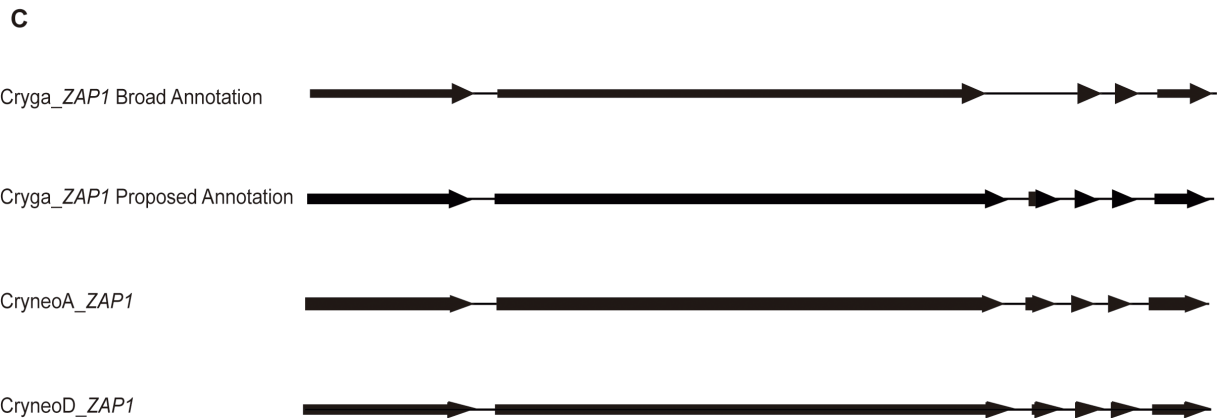


Figure S1: *In silico* characterization of *C. gattii* Zap1. Multiple sequence alignment of the Zap1 ortholog sequences of *C. neoformans* serotype D Zap1 (CryneoD_Zap1 – Genbank XP_572252) and *C. neoformans* serotype A Zap1 (CryneoA_Zap1 – Broad Institute CNAG_05392) with the *C. gattii* Zap1 Broad Institute (A) and the proposed sequences (B). The predicted zinc fingers are shown as shaded black boxes. (C) Comparison of the

CNBG_4460 locus (Supercontig 11: 588643–591042) automatic annotation and the proposed annotation with the annotated sequences of *ZAP1* from *C. neoformans* serotype D (CryneoD_*ZAP1* – Genbank NC_006693) and *C. neoformans* serotype A (CryneoA_*ZAP1* – Broad Institute CNAG_05392). Exons are depicted with arrows and arrowheads.

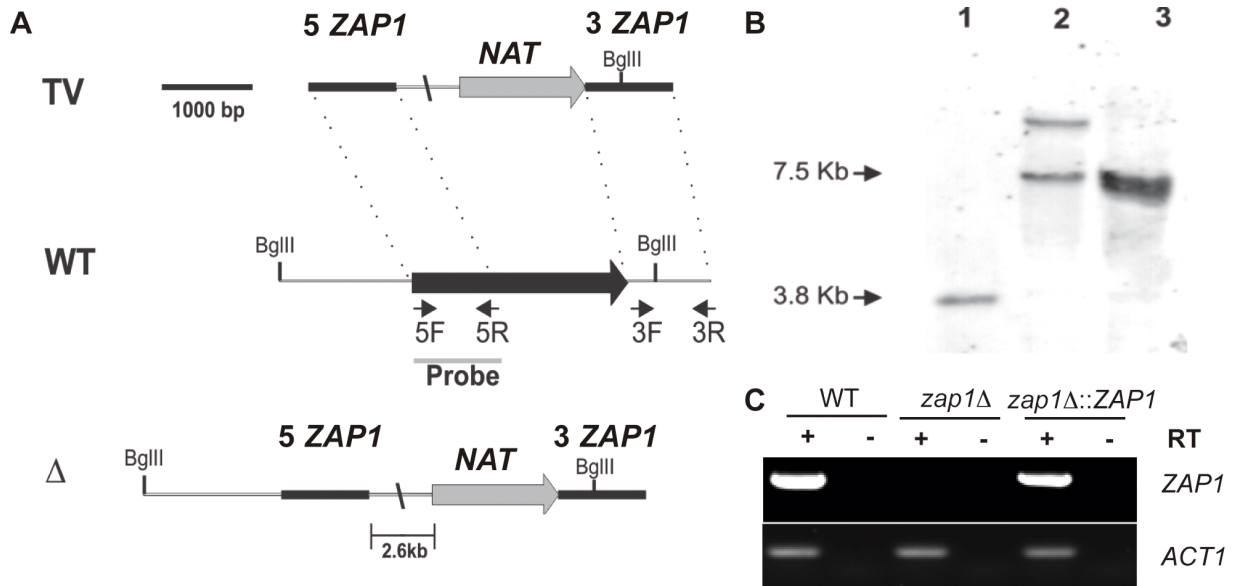


Figure S2: Construction of the *C. gattii ZAP1* gene knockout and complemented strains.

A. *ZAP1* deletion scheme. TV represents the targeting vector constructed by Delsgate methodology. 5 ZAP1 and 3 ZAP1 represent the 5' and 3' flanking regions of the *ZAP1* gene, respectively. 5F and 5R: primers utilized to amplify the 5' flanking region of *ZAP1*. 3F and 3R: primers utilized to amplify the 3' flanking region of *ZAP1*. Nat: cassette that confers nourseothricin resistance. WT represents the wild type locus of the *ZAP1* gene in the R265 strain. Δ represents the *ZAP1* locus in the *zap1* mutant strain. The cleavage sites of the *Bgl*III restriction enzyme are indicated. B. Confirmation by Southern blotting. Genomic DNA (10 μg) from WT (lane 1), *zap1Δ::ZAP1* complemented (lane 2) and *zap1Δ* mutant (lane 3) strains was digested with *Bgl*III. The 3' flanking region was used as the probe for Southern hybridization. Numbers on the left indicate the hybridization signal sizes based upon the position of the molecular size marker. C. Semi-quantitative RT-PCR using cDNA from WT,

zap1 Δ mutant and *zap1* Δ ::ZAP1 complemented strains as the template. RNA samples were used as templates for reactions employing (+) reverse transcriptase. Control reactions without reverse transcriptase addition (-) were used to confirm the absence of genomic DNA. The upper panel shows the *ZAP1* amplicons, while the lower panel shows the *ACT1* amplicons (loading control).

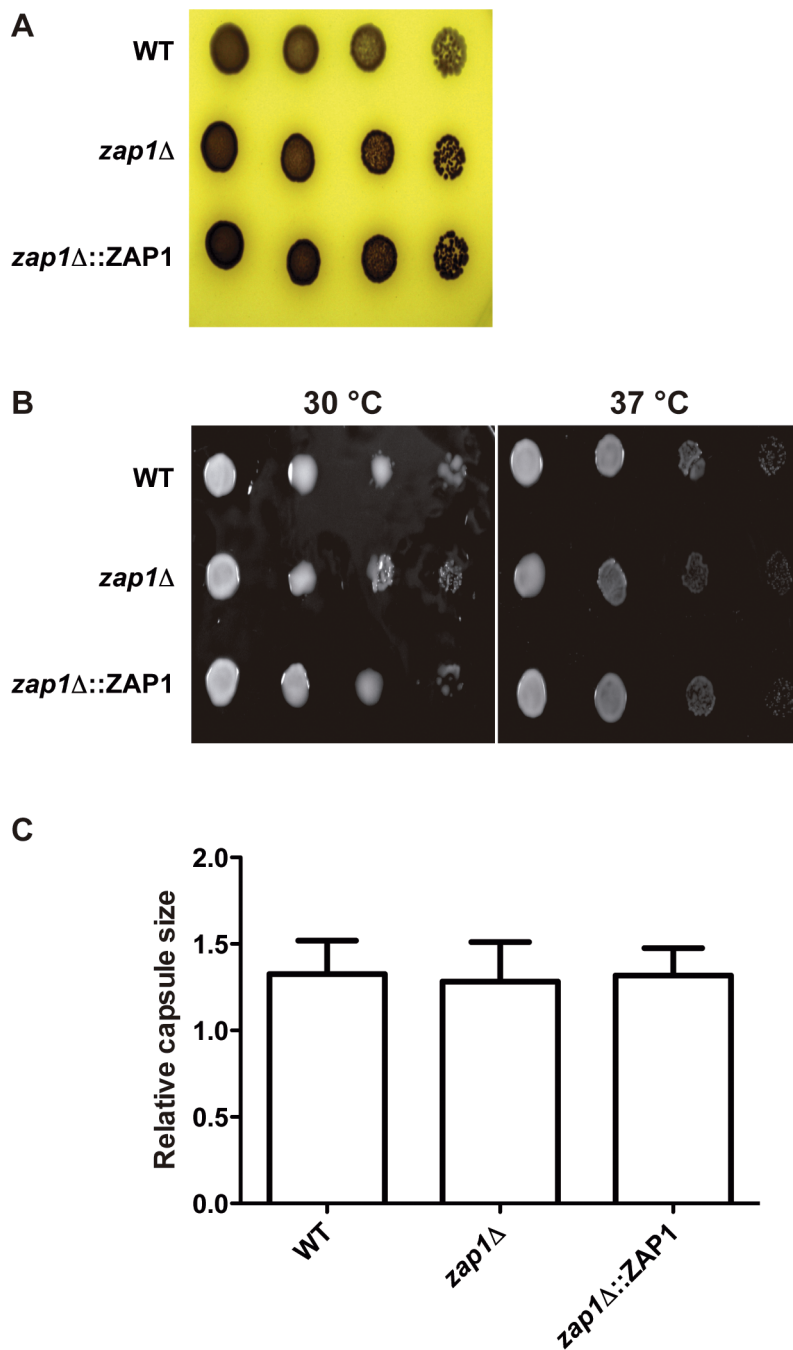


Figure S3: **Analysis of virulence-related phenotypes of the *C. gattii* ZAP1 null mutant.** (A) Melanin production was assessed by plating ten-fold serial dilutions of WT, *zap1* Δ mutant and *zap1* Δ ::ZAP1 complemented strains in niger seed agar and incubating for 48 h. (B) Ability to replicate at body temperature was assessed by plating ten-fold serial dilutions of WT, *zap1* Δ

mutant and *zap1Δ::ZAP1* complemented strains in YNB agar and incubating at 30 or 37°C for 24 h. (C) Capsule production was evaluated by analysis of the capsule/cell ratio of 100 distinct cells from WT, *zap1Δ* mutant and *zap1Δ::ZAP1* cells cultured in capsule-inducing conditions.

Table S1: Complete list of Zap1-regulated genes with at least 2-fold differential expression. A lista completa pode ser encontrada no endereço <http://www.plosone.org/article/fetchSingleRepresentation.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0043773.s004>

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

Primer name	Sequence (5'-3')	Purpose
ZAP1-5F	AAAATAGGGATAACAGGGTAATCA GCCACAACAATCCTTGGG	5-flank amplicon of <i>ZAP1</i> knockout construct / RT-PCR
ZAP1-5R	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAG CAGGCTATATCCCACATGCACGATA GTA	5-flank amplicon of <i>ZAP1</i> knockout construct / RT-PCR
ZAP1-3F	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTAGCGGTAAGAAATTTTCAC GT	3-flank amplicon of <i>ZAP1</i> knockout construct
ZAP1-3R	AAAAATTACCCTGTTATCCCTAGCA ACTTGAGACCGTCCCCT	3-flank amplicon of <i>ZAP1</i> knockout construct
ZAP1compF	ACAGCTATGACCATGATTACTTTTC TATATGCAACAACTAGTCG	<i>ZAP1</i> amplicon for complementation
ZAP1compR	GCACACTGGCGGCCGTTACTAATA AATTGATTACACGA	<i>ZAP1</i> amplicon for complementation
CGACTF	CGGTATCGTCACAAACTGG	Amplification of <i>ACT1</i> for RT-PCR/qRT-PCR
CGACTR	GGAGCCTCGGTAAGAAGAAC	Amplification of <i>ACT1</i> for RT-PCR/qRT-PCR
RTCgZAP1F	GTGGCGAAGAAGGGAGAATG	Amplification of <i>ZAP1</i> for qRT-PCR
RTCgZAP1R	ACAGTACGGGCAGACAAATGG	Amplification of <i>ZAP1</i> for qRT-PCR
CNBG5153R	CAACATCGCTAACCTTAGTGC	Amplification of <i>GPX2</i> for qRT-PCR
CNBG5153F	GAGTGACTTTCCTATTGCC	Amplification of <i>GPX2</i> for qRT-PCR
CNBG4202F	GAACGAGGTCTTTGCTTG	Amplification of <i>GPX1</i> for qRT-

		PCR
CNBG4202R	GCTTCTCTGGCTTAGTGG	Amplification of <i>GPX1</i> for qRT-PCR
CNBG4667F	ACTTCCGACTCTGCTGATTC	Amplification of <i>CAT3</i> for qRT-PCR
CNBG4667R	GCTGAAAGGGGTAGATTCC	Amplification of <i>CAT3</i> for qRT-PCR
CNBG5786F	CGTCAGTGAGGTTTATGCG	Amplification of <i>CAT2</i> for qRT-PCR
CNBG5786R	GATGTGTATGCCGTAACCTCG	Amplification of <i>CAT2</i> for qRT-PCR
CNBG4696F	TCACTACTGCGAAGGTTTTG	Amplification of <i>CAT1</i> for qRT-PCR
CNBG4696R	AAGACTGGGATGTTGTTGC	Amplification of <i>CAT1</i> for qRT-PCR
CNBG0599F	TCCCGTTACTGTTTCTGG	Amplification of Cu/Zn SOD transcript for qRT-PCR
CNBG0599R	GTTGCCGTCAGTCTTGAC	Amplification of Cu/Zn SOD transcript for qRT-PCR
CNBG2661F	CCTTCCCCGAACTACTCTC	Amplification of Mn-SOD transcript for qRT-PCR
CNBG2661R	CGTAAGTCTGGTGATGCTTG	Amplification of Mn- SOD transcript for qRT-PCR
CNBG5361F	GTGTAGCCCTTCTTTTCTCC	Amplification of <i>ZIP3</i> for qRT-PCR
CNBG5361R	CAATCCTGTCCGTTGGTAC	Amplification of <i>ZIP3</i> for qRT-PCR
CNBG6066F	GCTGAAGTCGCCGCTTATC	Amplification of <i>ZIP1</i> for qRT-PCR
CNBG6066R	GGGAGGGATGGATGTGATG	Amplification of <i>ZIP1</i> for qRT-PCR

CNBG2209F	GTCATATTGGGCAAACCTGG	Amplification of <i>ZIP2</i> for qRT-PCR
CNBG2209R	AGGGGCAACAGACTCATAG	Amplification of <i>ZIP2</i> for qRT-PCR

5. CAPÍTULO 2 – Caracterização dos transportadores de zinco da família ZIP em *Cryptococcus gattii*

5.1 Introdução

Transportadores de zinco da família ZIP são encontrados em todos os níveis filogenéticos, incluindo bactérias, fungos, plantas e mamíferos. O mecanismo de transporte realizado pelos transportadores ZIP ainda não é bem caracterizado. Sabe-se que em *S. cerevisiae* o transporte realizado por Zip1 é dependente de energia, ao contrário de Zip2 em humanos (Gaither e Eide, 2001). Em *Saccharomyces cerevisiae*, o mecanismo de captura de zinco é primariamente realizado por dois mecanismos, um de alta afinidade, realizado pela proteína codificada pelo gene *ZRT1* (Zhao e Eide, 1996a), e outro de baixa afinidade, realizado pela proteína codificada pelo gene *ZRT2* (Zhao e Eide, 1996b). Apesar da classificação, tanto a expressão do gene *ZRT1* quanto de *ZRT2*, é regulada pela disponibilidade de zinco, a limitação desse metal induz a expressão de desses genes, já a disponibilidade, reprime a transcrição (Zhao e Eide, 1997).

Em *A. fumigatus*, as proteínas ZrfA e ZrfB são similares a transportadores de metais de membrana, especialmente quando comparados com os transportadores de zinco da família ZIP. Além disso, a expressão relativa dos genes *zrfA* e *zrfB* é regulada pela disponibilidade de zinco, visto que, quando o fungo é cultivado na condição de privação de ferro ou cobre, não são observadas diferenças nos níveis de transcritos, já quando cultivado na condição de privação de zinco, altos níveis de transcritos foram detectados (Vicente-franqueira *et al.*, 2005). Nesse contexto, demonstramos por meio de análises de expressão que alguns transportadores

de zinco da família ZIP em *C. gattii* não são apenas regulados pela disponibilidade de zinco, sugerindo assim, que alguns poderiam compor mecanismo de baixa afinidade.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Condições de cultivo

Células de *C. gattii*, linhagem R265, foram cultivadas em 3 diferentes condições. O meio de cultura utilizado foi o Yeast Nitrogen Base (YNB) (Difco), sendo que, para mimetizar a condição de privação de ferro, utilizou-se o agente quelante BPDS na concentração de 10 μ M, e para a condição de privação de cobre, o agente quelante BCS, na mesma concentração. Um pré-cultivo de 18 horas, a 37°C sob agitação constante de 200 RPM foi realizado. Para tal, utilizou-se o meio de cultura YPD, composto de 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de dextrose. Após o pré-cultivo, as células foram centrifugadas, lavadas 3 vezes e ressuspensas em tampão PBS. Um volume de 10⁷ células/ml foi inoculado em 50 ml de YNB contendo ou não o respectivo agente quelante. Após duas horas, o cultivo foi centrifugado e as células congeladas para posterior extração de RNA. Importante lembrar que os cultivos para extração de RNA foram realizados em triplicatas biológicas.

5.2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a extração de RNA utilizou-se o protocolo do reagente TRIzol (INVITROGEN). O RNA extraído foi tratado com enzima DNase I (PROMEGA) e uma reação de PCR foi realizada, certificando assim, que a amostra encontrava-se livre de DNA. Para a síntese de cDNA, utilizou-se 0,2µg de RNA, e a reação foi realizada utilizando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (INVITROGEN) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Uma reação de PCR também foi realizada utilizando primers da actina, comprovando a síntese da fita complementar.

5.2.3 qPCR em Tempo Real

As reações de PCR quantitativo em tempo real foram realizadas utilizando o kit Platinum SYBR green qPCR Supermix (INVITROGEN) de acordo com instruções do fabricante. As reações foram suplementadas com 5pmol de cada primer e 1 µl de cDNA, em um volume final de 25µl. As reações foram realizadas com um estágio de desnaturação inicial de 5 min a 95°C, seguido de 40 ciclos composto de 3 etapas, desnaturação por 15 s a 95°C, anelamento por 15 s a 55°C e extensão por 1 min a 72°C. As reações foram realizadas no sistema de PCR em Tempo Real Applied Biosystems StepOne e as análises de expressão relativa foram realizadas pela metodologia $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001), utilizando o gene codificador da actina como normalizador. No final da reação, a análise da curva de desnaturação foi realizada, comprovando a presença de um único produto de PCR.

5.3 Resultados

5.3.1 Identificação de genes codificantes para os transportadores de zinco da família ZIP no genoma de *C. gattii*

Primeiramente foi realizada uma análise *in silico* utilizando domínios conservados das proteínas da família ZIP (PFAM ID PF02535) no proteoma predito de *C. gattii* junto ao Broad Institute (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans_b/MultiHome.html). Por meio desta análise, identificamos 4 genes codificadores para os transportadores de zinco da família ZIP no genoma de *C. gattii*: *ZIP1* (CNBG_2209), *ZIP2* (CNBG_6066), *ZIP3* (CNBG_5361) e *ZIP4* (CNBG_3336). Após identificação dos genes, foram construídos primers para posteriores análises de expressão. Análises de expressão do gene *ZIP4* por RT-PCR em tempo real revelaram que a indução da expressão deste transportador se dá pela presença de zinco no meio de cultura, efeito oposto aos dos demais transportadores (Figura 7). Assim este transportador não foi utilizado nos testes posteriores.

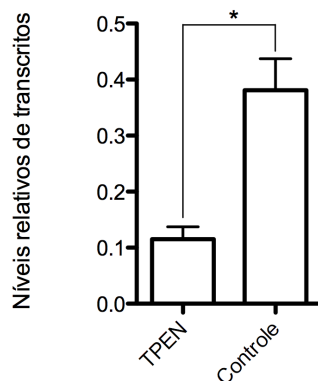


Figura 7. **Níveis de transcritos do gene ZIP4 em presença e ausência de zinco.** Linhagem R265 de *C. gattii* foi cultivada por duas horas na condição controle (YNB) ou privação de zinco (Cho *et al.*). A quantidade de transcritos foi normalizada usando os valores de Ct referentes aos transcritos de actina. Dados se referem à média de 3 réplicas de 3 réplicas biológicas, assim como o desvio padrão. *, $P < 0.05$ de acordo com o teste t-student.

5.3.2 ZIP1 e ZIP3 possuem expressão regulada pela disponibilidade de ferro

Como resultados preliminares, analisamos os níveis de expressão dos três transportadores de zinco da família ZIP em *C. gattii* em três diferentes condições: controle, privação de ferro (BPDS) e privação de cobre (BCS). Demonstramos que ZIP1 (CNBG_2209) apresentou leve aumento na expressão na condição de privação de ferro, e ZIP3 (CNBG_5361) apresentou elevado aumento de expressão nessa condição, sugerindo que esses transportadores não atuam somente no transporte de zinco, sendo assim, uma evidência da baixa especificidade tanto de ZIP1 quanto de ZIP3 (Figura 8).

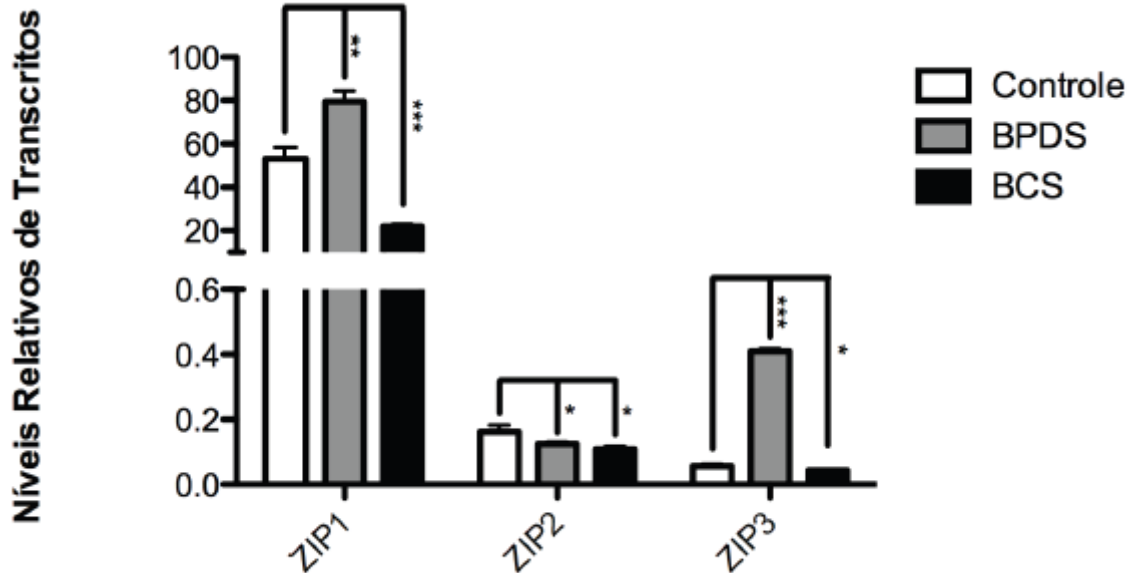


Figura 8. Níveis de transcritos dos genes codificadores dos transportadores de zinco da família ZIP em diferentes condições. Linhagem R265 de *C. gattii* foi cultivada por duas horas na condição controle (YNB), privação de ferro (BPDS) e privação de cobre (BCS). As análises de expressão demonstraram que ZIP1 e ZIP3 apresentaram aumento nos níveis de transcritos quando na condição de privação de ferro. A quantidade de transcritos foi normalizada usando os valores de Ct referentes aos transcritos de actina. Dados se referem à média de 3 réplicas biológicas, assim como o desvio padrão. * , $P < 0.05$ de acordo com o teste t-student.

6. DISCUSSÃO

A homeostase de zinco na célula é realizada por mecanismos regulatórios homeostáticos, os quais podem ser tanto em níveis pós-traducionais, como em níveis transcricionais (Lyons *et al.*, 2000). Em *S. cerevisiae*, dois mecanismos de captura de zinco são descritos. Um deles, considerado um sistema de alta afinidade, é ativado na condição de privação de zinco, e o outro, considerado de baixa afinidade por esse metal, não possui sua atividade regulada pela disponibilidade de metal (Zhao e Eide, 1996b). Porém, a regulação da expressão tanto do sistema de alta quanto do de baixa afinidade é realizada pela fator de transcrição de Zap1p, o qual possui papel fundamental na homeostase desse metal (Zhao e Eide, 1997). Além disso, a exposição de *C. neoformans* a complexos calprotectina resulta em inibição do crescimento e morte celular (Mambula *et al.*, 2000), demonstrando a condição de privação de zinco a qual o patógeno é exposto durante o processo infeccioso. No presente trabalho, caracterizamos o homólogo de Zap1p de *S. cerevisiae* em *C. gattii*. O estudo permitiu concluir que o fator de transcrição Zap1 regula a homeostase de zinco nesse patógeno, além de avaliar as influências que os baixos níveis desse metal causam na célula e seus efeitos na patogenicidade.

Primeiramente, a análise *in silico* da proteína predita demonstrou a presença de diversos domínios dedos de zinco C_2H_2 , além disso, uma maior conservação na sequência dessa proteína foi constatada justamente nesses domínios de ligação ao DNA, demonstrando sua conservação em relação aos homólogos de outras espécies já descritos até o momento. Após a identificação do ortólogo, análises de expressão de *ZAPI* foram realizadas, e o grande

aumento da expressão do gene na condição de privação de zinco serviu-nos de evidência que essa proteína possui papel importante na homeostase desse metal. Assim, para melhor caracterizar a função desse fator de transcrição na célula, uma linhagem mutante de *C. gattii* para *ZAPI* foi construída e caracterizada. A linhagem mutante demonstrou sensibilidade à condição de privação de zinco, corroborando com dados descritos na literatura, onde a linhagens mutantes para os homólogos *ZAPI* em *S. cerevisiae* (Zhao *et al.*, 1998), *ZafA* em *A. fumigatus* (Moreno *et al.*, 2007) e *CSRI* em *C. albicans* (Kim *et al.*, 2008) demonstraram essa mesma característica. Além disso, o aumento da expressão dos genes codificadores dos transportadores de zinco da família *ZIP* na linhagem selvagem, nos levou a concluir que Zap1 regula positivamente a expressão desses genes na condição de privação de zinco. Este resultado serve de evidência para os baixos níveis de zinco intracelular detectados na linhagem mutante.

Em linhagens mutantes de *ZAPI* de *S. cerevisiae*, o acúmulo de EROs intracelular é observado (Eide, 2009). Além disso, o gene *ZAPI* de *S. cerevisiae* está envolvido na regulação do gene codificador de catalase *CTT1*, provavelmente atuando na detoxificação de EROs na condição de privação de zinco (Wu *et al.*, 2007). Nesse contexto, testes de sensibilidade a fontes de EROs, como menadiona, TBOOH e peróxido de hidrogênio foram realizados, porém nenhuma diferença de sensibilidade foi observada. Além disso, não foram observadas diferenças nos níveis de transcritos de genes codificadores para catalases, demonstrando que Zap1 não participa da regulação da expressão desses genes. Apesar disso, em *C. gattii*, na ausência de *ZAPI*, um acúmulo de EROs intracelular é observado e, além disto, um aumento na expressão de *Cu/Zn-SOD* foi detectado na linhagem mutante, provavelmente atuando como mecanismo de adaptação aos altos níveis de EROs intracelular. Entretanto, existe outra

possibilidade para esse aumento na expressão observado, frente à redução nos níveis de proteínas com domínios de ligação a zinco na linhagem mutante, ocorreria uma maior disponibilidade desse metal para outras proteínas, como a própria Cu/Zn-SOD, atuando na adaptação das células frente à condição de estresse.

Em *S. cerevisiae*, os níveis intracelulares de glutathione são mais baixos quando na condição de limitação de zinco, sugerindo que essa enzima atua diretamente na detoxificação de ERO (Eide, 2009). Em *C. gattii*, a linhagem mutante *zap1* demonstrou maior sensibilidade ao agente depletor de glutathione dietilmalato, sugerindo assim, níveis mais baixos dessa enzima na célula. A comprovação dessa evidência foi possível, pois um grande aumento na expressão do gene GPx2 foi observado na linhagem mutante. Certamente o produto deste gene, o qual utiliza glutathione no combate as EROs, mantém baixos os níveis dessa enzima nas células mutantes. Além do estresse oxidativo, patógenos são expostos a espécies reativas de nitrogênio (ERN) durante o processo infeccioso. Essa produção dos agentes estressores é realizada pelas células do sistema imune, onde já foi demonstrado que graças a essa estratégia, *C. neoformans* e outras espécies de fungos patogênicos possuem seu desenvolvimento dificultado durante o processo infeccioso (Gross *et al.*, 1999). Em *C. gattii*, demonstramos que a ausência de *ZAP1* ocasiona uma maior sensibilidade ao agente indutor de espécies reativas de nitrogênio DETA-NONOato, demonstrando a importância da homeostase de zinco no processo infeccioso, frente às defesas impostas pelo sistema imune do hospedeiro, justificando a baixa virulência da linhagem mutante. Além disso, a análise do transcriptoma de *C. gattii* revelou que a linhagem mutante apresentou uma baixa expressão do gene *FBH1*, ortólogo de *S. cerevisiae* e codificador da enzima flavohemoglobina-denitrosilase, explicando a maior sensibilidade da linhagem mutante.

A análise do transcriptoma demonstrou que vários genes são regulados tanto positivamente quanto negativamente por Zap1. Porém, a expressão de alguns deles, como de algumas proteínas ligadoras de zinco, poderia estar relacionada com o cultivo na condição de privação de zinco, e assim, não serem diretamente regulados negativamente por Zap1. Alguns genes codificadores para desidrogenases apresentaram expressão mais baixa na linhagem selvagem. Esse perfil de expressão poderia estar relacionado com os baixos níveis de zinco na qual a célula foi cultivada, visto que, Eide e colaboradores (2009), descreveram um mecanismo denominado conservação de zinco, no qual metaloproteínas essenciais para a sobrevivência da células na condição de estresse, teriam a preferência pela associação por zinco. Sabendo que as desidrogenases são as proteínas ligadoras de zinco mais abundantes na células (Eide, 2009), sua expressão seria reduzida, liberando zinco para outras proteínas, como a Cu/Zn-SOD, a qual é de extrema importância para a sobrevivência da célula na condição em questão.

No presente trabalho foi demonstrado que Zap1 desempenha papel fundamental no metabolismo de zinco em *C. gattii*. Corroborando com resultados obtidos em *S. cerevisiae*, onde a proteína Zap1p regula positivamente os genes *ZRT1* e *ZRT2* em resposta a disponibilidade de zinco, sendo que, nesse microrganismo, a proteína codificada pelo gene *ZRT2* é considerada um transportador de baixa afinidade (Zhao e Eide, 1997). Neste estudo, demonstramos que três transportadores de zinco da família ZIP possuem sua expressão regulada pela disponibilidade de zinco, sendo que ZIP1 e ZIP2 apresentaram menores níveis de transcritos ausência do fator de transcrição Zap1. Além disso, *C. gattii* cultivado na condição de privação de ferro, demonstrou aumento nos níveis de transcritos de *ZIP3*,

sugerindo ser um sistema de transporte de baixa afinidade. Apesar dos resultados obtidos, mais ensaios bioquímicos são necessários para tal conclusão.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Por meio de diferentes experimentos, podemos afirmar que Zap1 é o principal regulador da homeostase de zinco em *C. gattii*. O fator de transcrição demonstrou regular a expressão de diversos genes envolvidos na homeostase desse metal, dessa maneira alterando os níveis de zinco intracelular. Tal estudo é de grande importância, pois podemos observar os efeitos que os baixos níveis de zinco causam na células, além da relação feita com estresse oxidativo e nitrosativo. Outro importante fator, é que mais uma vez provou-se que a homeostase de zinco está diretamente relacionada com a virulência dos patógenos, sendo o presente fator de transcrição, um candidato para futuros estudos de desenvolvimento de drogas terapêuticas.

Como citado anteriormente, o trabalho desenvolvido por Simm e colaboradores (2011), um composto antiprotozoário e antiparasítico (atovaquona) e um agente antimalárico (halofantrina), foram capazes de diminuir os níveis de zinco intracelular em *Candida albicans* e conseqüentemente, diminuindo a filamentação, um importante fator de virulência nesta levedura. Assim, a caracterização de sistemas conservados de metabolismo de zinco em leveduras e fungos poderá levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas por meio da utilização de compostos químicos já bem caracterizados do ponto de vista farmacocinético e farmacodinâmico, assim como a segurança para o paciente.

Diversas vezes foi demonstrado que o metabolismo de zinco é de extrema importância para o desenvolvimento de uma infecção fúngica. Além disso, os transportadores de zinco da família ZIP são importantes para o crescimento de *S. cerevisiae* na condição de privação de zinco (Eide, 2006). Em virtude disso, em experimentos futuros daremos continuidade à caracterização dos transportadores de zinco da família ZIP em *C. gattii*. No presente trabalho foi demonstrado que três deles apresentaram sua expressão regulada pela disponibilidade de zinco, e que ZIP3 apresentou evidências de ser um transportador de baixa afinidade. A construção de mutantes nulos para os genes codificadores para essas proteínas irá permitir a melhor compreensão do funcionamento da homeostase de zinco em *C. gattii*, visto a importância da homeostase de metais na virulência deste patógeno.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. **Curr Biol**, v. 16, n. 21, p. 2161-5, Nov 2006. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17084702> >.
- AMICH, J.; LEAL, F.; CALERA, J. A. Repression of the acid ZrfA/ZrfB zinc-uptake system of *Aspergillus fumigatus* mediated by PacC under neutral, zinc-limiting conditions. **Int Microbiol**, v. 12, n. 1, p. 39-47, Mar 2009. ISSN 1618-1905. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19440982> >.
- AULD, D. S. Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. **Biometals**, v. 14, n. 3-4, p. 271-313, 2001 Sep-Dec 2001. ISSN 0966-0844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11831461> >.
- BAVEYE, S. et al. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. **Clin Chem Lab Med**, v. 37, n. 3, p. 281-6, Mar 1999. ISSN 1434-6621. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10353473> >.
- BOSE, I. et al. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 4, p. 655-63, Aug 2003. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12912884> >.
- BOTTS, M. R. et al. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* spores reveal a critical role for capsule biosynthesis genes in spore biogenesis. **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 4, p. 595-605, Apr 2009. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19181873> >.
- BULLEN, J. J. et al. Natural resistance, iron and infection: a challenge for clinical medicine. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 3, p. 251-8, Mar 2006. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476787> >.
- BUN-YA, M. et al. The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. **Mol Cell Biol**, v. 11, n. 6, p. 3229-38, Jun 1991. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2038328> >.

- BYRNES, E. J.; HEITMAN, J. *Cryptococcus gattii* outbreak expands into the Northwestern United States with fatal consequences. **F1000 Biol Rep**, v. 1, 2009. ISSN 1757-594X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20150950> >.
- CHAKRABARTI, A. et al. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 12, p. 3340-2, Dec 1997. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9399553> >.
- CHENG, M. F. et al. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 4, p. 1608-11, Apr 2001. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283097> >.
- CHUN, C. D.; MADHANI, H. D. Ctr2 links copper homeostasis to polysaccharide capsule formation and phagocytosis inhibition in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS One**, v. 5, n. 9, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20824073> >.
- CITIULO, F. et al. *Candida albicans* scavenges host zinc via Pra1 during endothelial invasion. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 6, p. e1002777, Jun 2012. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22761575> >.
- COX, G. M. et al. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. **Infect Immun**, v. 71, n. 1, p. 173-80, Jan 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12496163> >.
- CRESTANI, J. et al. Proteomic profiling of the influence of iron availability on *Cryptococcus gattii*. **J Proteome Res**, v. 11, n. 1, p. 189-205, Jan 2012. ISSN 1535-3907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21970549> >.
- DEL POETA, M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1067-75, Oct 2004. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15470235> >.
- DEVIRGILIIS, C. et al. Exchangeable zinc ions transiently accumulate in a vesicular compartment in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 323, n. 1, p. 58-64, Oct 2004. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15351701> >.

EIDE, D. J. The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annu Rev Nutr**, v. 18, p. 441-69, 1998. ISSN 0199-9885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9706232> >.

EIDE, D. J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. **Biochim Biophys Acta**, v. 1763, n. 7, p. 711-22, Jul 2006. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16675045> >.

EIDE, D. J. Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 284, n. 28, p. 18565-9, Jul 2009. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19363031> >.

ELLIS, D. et al. Epidemiology: surveillance of fungal infections. **Med Mycol**, v. 38 Suppl 1, p. 173-82, 2000. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11204143> >.

ENG, B. H. et al. Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. **J Membr Biol**, v. 166, n. 1, p. 1-7, Nov 1998. ISSN 0022-2631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9784581> >.

FELDMESSER, M. et al. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. **Infect Immun**, v. 68, n. 7, p. 4225-37, Jul 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858240> >.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 3, p. 838-40, Mar 1999. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9986871> >.

FREDERICKSON, C. J. et al. Depletion of intracellular zinc from neurons by use of an extracellular chelator in vivo and in vitro. **J Histochem Cytochem**, v. 50, n. 12, p. 1659-62, Dec 2002. ISSN 0022-1554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12486088> >.

GAITHER, L. A.; EIDE, D. J. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. **Biomaterials**, v. 14, n. 3-4, p. 251-70, 2001 Sep-Dec 2001. ISSN 0966-0844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11831460> >.

GROSS, N. T. et al. Production of nitric oxide by rat alveolar macrophages stimulated by *Cryptococcus neoformans* or *Aspergillus fumigatus*. **Med Mycol**, v. 37, n. 3, p. 151-7, Jun 1999. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10421846> >.

GÓMEZ, B. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and fungi. **Curr Opin Infect Dis**, v. 16, n. 2, p. 91-6, Apr 2003. ISSN 0951-7375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12734441> >.

HAASE, H.; BEYERSMANN, D. Intracellular zinc distribution and transport in C6 rat glioma cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 296, n. 4, p. 923-8, Aug 2002. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200136> >.

HE, W. et al. Phagocytic activity and monocyte chemotactic protein expression by pulmonary macrophages in persistent pulmonary cryptococcosis. **Infect Immun**, v. 71, n. 2, p. 930-6, Feb 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12540575> >.

IROKANULO, E. O. et al. *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* isolated from droppings of captive birds in Nigeria. **J Wildl Dis**, v. 33, n. 2, p. 343-5, Apr 1997. ISSN 0090-3558. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9131573> >.

JACOBSON, E. S.; COMPTON, G. M. Discordant regulation of phenoloxidase and capsular polysaccharide in *Cryptococcus neoformans*. **J Med Vet Mycol**, v. 34, n. 4, p. 289-91, 1996 Jul-Aug 1996. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8873890> >.

JUNG, W. H.; KRONSTAD, J. W. Iron and fungal pathogenesis: a case study with *Cryptococcus neoformans*. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 277-84, Feb 2008. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042257> >.

JUNG, W. H.; KRONSTAD, J. W.. Iron influences the abundance of the iron regulatory protein Cir1 in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **FEBS Lett**, v. 585, n. 20, p. 3342-7, Oct 2011. ISSN 1873-3468. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21963719> >.

- JUNG, W. H. et al. Iron source preference and regulation of iron uptake in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 2, p. e45, Feb 2008. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18282105> >.
- JUNG, W. H. et al. Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Biol**, v. 4, n. 12, p. e410, Nov 2006. ISSN 1545-7885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17121456> >.
- KIDD, S. E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 49, p. 17258-63, Dec 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572442> >.
- KIM, M. J. et al. Roles of Zinc-responsive transcription factor Csr1 in filamentous growth of the pathogenic Yeast *Candida albicans*. **J Microbiol Biotechnol**, v. 18, n. 2, p. 242-7, Feb 2008. ISSN 1017-7825. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18309267> >.
- KRONSTAD, J.; JUNG, W. H.; HU, G. Beyond the big three: systematic analysis of virulence factors in *Cryptococcus neoformans*. **Cell Host Microbe**, v. 4, n. 4, p. 308-10, Oct 2008. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18854233> >.
- KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 193-203, Mar 2011. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326274> >.
- KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A**, v. 257, n. 2, p. 213-8, Jul 1984. ISSN 0176-6724. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6207684> >.
- KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 574-87, Jun 2006. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16696653> >.
- LI, S. S.; MODY, C. H. *Cryptococcus*. **Proc Am Thorac Soc**, v. 7, n. 3, p. 186-96, May 2010. ISSN 1943-5665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463247> >.

- LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. **Infect Genet Evol**, v. 9, n. 4, p. 401-16, Jul 2009. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19460306> >.
- LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 69-105, 2006. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16704346> >.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(Livak e Schmittgen) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.
- LULLOFF, S. J.; HAHN, B. L.; SOHNLE, P. G. Fungal susceptibility to zinc deprivation. **J Lab Clin Med**, v. 144, n. 4, p. 208-14, Oct 2004. ISSN 0022-2143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15514589> >.
- LYONS, T. J. et al. Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 14, p. 7957-62, Jul 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10884426> >.
- MACDIARMID, C. W.; GAITHER, L. A.; EIDE, D. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J**, v. 19, n. 12, p. 2845-55, Jun 2000. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10856230> >.
- MAMBULA, S. S. et al. Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 68, n. 11, p. 6257-64, Nov 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11035733> >.
- MANSOUR, M. K.; LEVITZ, S. M. Interactions of fungi with phagocytes. **Curr Opin Microbiol**, v. 5, n. 4, p. 359-65, Aug 2002. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12160853> >.
- MERKEL, G. J.; CUNNINGHAM, R. K. The interaction of *Cryptococcus neoformans* with primary rat lung cell cultures. **J Med Vet Mycol**, v. 30, n. 2, p. 115-21, 1992. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1588461> >.

- MEYER, W. et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA—a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v. 20, n. 8, p. 1790-9, Jun 1999. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10435451> >.
- MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS—100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 4, p. 515-48, Oct 1995. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665468> >.
- MOOSBRUGGER, E. A.; ADAMS, B. B.; KRALOVIC, S. M. Cutaneous cryptococcosis in a patient on corticosteroid therapy for rheumatoid arthritis. **Int J Dermatol**, v. 47, n. 6, p. 630-2, Jun 2008. ISSN 1365-4632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18477165> >.
- MORENO, M. A. et al. The regulation of zinc homeostasis by the ZafA transcriptional activator is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. **Mol Microbiol**, v. 64, n. 5, p. 1182-97, Jun 2007. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17542914> >.
- MORENO, T. et al. Serum copper concentration in HIV-infection patients and relationships with other biochemical indices. **Sci Total Environ**, v. 217, n. 1-2, p. 21-6, Jun 1998. ISSN 0048-9697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9695170> >.
- NIELSEN, K.; DE OBALDIA, A. L.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 6, p. 949-59, Jun 2007. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449657> >.
- NOBILE, C. J. et al. Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. **PLoS Biol**, v. 7, n. 6, p. e1000133, Jun 2009. ISSN 1545-7885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19529758> >.
- PAGANO, L.; FIANCHI, L.; LEONE, G. Fungal pneumonia due to molds in patients with hematological malignancies. **J Chemother**, v. 18, n. 4, p. 339-52, Aug 2006. ISSN 1120-009X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17024788> >.

- PALMITER, R. D.; FINDLEY, S. D. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. **EMBO J**, v. 14, n. 4, p. 639-49, Feb 1995. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7882967> >.
- PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 3, n. 1, p. 77-102, Mar 1989. ISSN 0891-5520. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2647836> >.
- PERFECT, J. R. et al. *Cryptococcus neoformans*: virulence and host defences. **Med Mycol**, v. 36 Suppl 1, p. 79-86, 1998. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9988495> >.
- PERICOLINI, E. et al. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide component galactoxylomannan induces apoptosis of human T-cells through activation of caspase-8. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 2, p. 267-75, Feb 2006. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16441437> >.
- PERLIN, D. S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. **Drug Resist Updat**, v. 10, n. 3, p. 121-30, Jun 2007. ISSN 1368-7646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17569573> >.
- PERSANS, M. W.; NIEMAN, K.; SALT, D. E. Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 17, p. 9995-10000, Aug 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11481436> >.
- QUAIFE, C. et al. Glucocorticoid regulation of metallothionein during murine development. **Dev Biol**, v. 118, n. 2, p. 549-55, Dec 1986. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3792622> >.
- REES, E. M.; THIELE, D. J. From aging to virulence: forging connections through the study of copper homeostasis in eukaryotic microorganisms. **Curr Opin Microbiol**, v. 7, n. 2, p. 175-84, Apr 2004. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15063856> >.
- SALAS, S. D. et al. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. **J Exp Med**, v. 184, n. 2, p. 377-86, Aug 1996. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8760791> >.

- SANTHANAGOPALAN, V.; HAHN, B. L.; SOHNLE, P. G. Resistance of zinc-supplemented *Candida albicans* cells to the growth inhibitory effect of calprotectin. **J Infect Dis**, v. 171, n. 5, p. 1289-94, May 1995. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7751705> >.
- SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. Iron and microbial infection. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 12, p. 946-53, Dec 2004. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15550940> >.
- SCHNEIDER, R. E. O. et al. Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43773, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22916306>>.
- SHI, M. et al. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **J Clin Invest**, v. 120, n. 5, p. 1683-93, May 2010. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20424328> >.
- SIMM, C. et al. High-throughput screen for identifying small molecules that target fungal zinc homeostasis. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e25136, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21980385> >.
- SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Med Mycol**, v. 39, n. 2, p. 155-68, Apr 2001. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11346263> >.
- SUGARMAN, B. Zinc and infection. **Rev Infect Dis**, v. 5, n. 1, p. 137-47, 1983 Jan-Feb 1983. ISSN 0162-0886. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6338570> >.
- TATSUMI, H. et al. Elucidation of the thermal stability of the neutral proteinase II from *Aspergillus oryzae*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1208, n. 1, p. 179-85, Sep 1994. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8086433> >.
- VICENTEFRANQUEIRA, R. et al. The *zrfA* and *zrfB* genes of *Aspergillus fumigatus* encode the zinc transporter proteins of a zinc uptake system induced in an acid, zinc-depleted environment. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 5, p. 837-48, May 2005. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15879518> >.

- WATERMAN, S. R. et al. Role of a CUF1/CTR4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Invest**, v. 117, n. 3, p. 794-802, Mar 2007. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17290306> >.
- WATERS, B. M.; EIDE, D. J. Combinatorial control of yeast FET4 gene expression by iron, zinc, and oxygen. **J Biol Chem**, v. 277, n. 37, p. 33749-57, Sep 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12095998> >.
- WEINBERG, E. D. Iron and susceptibility to infectious disease. **Science**, v. 184, n. 4140, p. 952-6, May 1974. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4596821> >.
- Weinberg, E. D.. Iron availability and infection. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n. 7, p. 600-5, Jul 2009. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18675317> >.
- WU, C. Y. et al. Regulation of the yeast TSA1 peroxiredoxin by ZAP1 is an adaptive response to the oxidative stress of zinc deficiency. **J Biol Chem**, v. 282, n. 4, p. 2184-95, Jan 2007. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17121842> >.
- XUE, C. et al. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. **Cell Host Microbe**, v. 1, n. 4, p. 263-73, Jun 2007. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18005707> >.
- ZHAO, H. et al. Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements. **J Biol Chem**, v. 273, n. 44, p. 28713-20, Oct 1998. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9786867> >.
- ZHAO, H.; EIDE, D. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 6, p. 2454-8, Mar 1996a. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8637895> >.
- ZHAO, H.; EIDE, D. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 271, n. 38, p. 23203-10, Sep 1996b. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8798516> >.

ZHAO, H.; EIDE, D. J. Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol**, v. 17, n. 9, p. 5044-52, Sep 1997. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9271382> >.

ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Res**, v. 5, n. 1, p. 1-10, Oct 2004. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15381117> >.