

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

**IDENTIFICAÇÃO *in silico* DE PROTEÍNAS ANCORADAS POR
GLICOSILFOSFATIDILINOSITOL NAS ESPÉCIES DO COMPLEXO
*Cryptococcus neoformans***

Dissertação de Mestrado

Eder Silva de Oliveira

Porto Alegre, outubro de 2010.

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

**IDENTIFICAÇÃO *in silico* DE PROTEÍNAS ANCORADAS POR
GLICOSILFOSFATIDILINOSITOL NAS ESPÉCIES DO COMPLEXO
*Cryptococcus neoformans***

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

Eder Silva de Oliveira

Orientadora: Prof^a. Dra. Marilene Henning Vainstein

Co-orientador: Prof. Dr. Augusto Schrank

Porto Alegre, outubro de 2010.

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, Professora Marilene Vainstein e Augusto Schrank pela oportunidade, confiança e aprendizado.

Aos membros da Comissão de acompanhamento do mestrado, Profº Arnaldo Zaha e Profº Charley C. Staats.

A todos os amigos do laboratório 220 e 218, por todos os momentos compartilhados durante esses anos de convivência.

A todos os amigos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Um agradecimento especial à Vanise, Bruno, Thiago e Pâmela, pelo carinho, apoio e amizade verdadeira.

Agradeço a minha família pelo apoio e amor constantes, em especial a minha Mãe, a quem dedico este trabalho.

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

SUMÁRIO

<i>Lista de abreviaturas, símbolos e unidades</i>	V
<i>Lista de Figuras</i>	VI
<i>Lista de Tabelas</i>	VII
<i>Resumo</i>	VIII
<i>Abstract</i>	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Aspectos Gerais</i>	1
1.2 <i>As espécies do Complexo C. neoformans e Virulência</i>	6
1.2.1 <i>A cápsula polissacarídica</i>	7
1.2.2 <i>Síntese de melanina</i>	8
1.2.3 <i>Desenvolvimento à 37°C</i>	9
1.3 <i>Os genomas das espécies do Complexo C. neoformans</i>	10
1.4 <i>Proteínas ancoradas por Glicosilfosfatidilinositol (GPI-Ps)</i>	11
1.4.1 <i>Estrutura e biossíntese das âncoras de GPI</i>	12
1.4.2 <i>Análise e predição in silico de GPI-Ps</i>	16
2. OBJETIVOS	21
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	21
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 <i>Identificação in silico de GPI-Ps</i>	22
3.2 <i>Comparação entre a composição de GPI-Ps presentes em C. neoformans var. grubii e C. gattii</i>	23
4. RESULTADOS	25
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
8. ANEXO	59
8.1 <i>CURRICULUM VITAE RESUMIDO</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C – *Graus Centígrados*

AIDS – *Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)*

AMPc – *Adenosina Monofosfato Cíclico*

BLASTp - *Basic Local Alignment Search Tool for Proteins*

DOPA - *dihidroxifenilalanina*

GXM - *Glicuronoxilomanana*

GalXM – *galactoxilomanana*

GPI- *Glicosilfosfatidilinositol*

GPI-P – *Proteína acoplada à âncora de Glicosilfosfatidilinositol*

HIV - *Vírus da Imunodeficiência Humana*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

ORFs – *Open Read Frames (Fases de Leitura Abertas)*

SNC - *Sistema Nervoso Central*

RE – *Retículo endoplasmático*

ω - *Sítio ômega. Sítio de clivagem do peptídeo para acoplamento da âncora de Glicosilfosfatidilinositol.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Ciclo de infecção de C. neoformans.</i>	4
Figura 2. <i>Ciclo de vida de C. neoformans.</i>	5
Figura 3. <i>Fatores de virulência em C. neoformans.</i>	6
Figura 4 . <i>Estrutura central de uma âncora de GPI.</i>	12
Figura 5. <i>Principal via de biossíntese de GPI em leveduras.</i>	15
Figura 6. <i>Fluxograma da metodologia utilizada para identificação de GPI-Ps nas espécies do Complexo C. neoformans..</i>	24

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** *Etapas do algoritmo empregado para identificação de GPI-Ps nas espécies do Complexo C. neoformans.* 25
- Tabela 2.** *Grupos de ortólogas das GPI-Ps identificadas em C. gattii (CNBG) e C. neoformans var. grubii (CNAG).*27
- Tabela 3.** *GPI-Ps identificadas em C. neoformans var. grubii (CNAG) e C. gattii (CNBG) que não agruparam por homologia de sequência.*32
- Tabela 4.** *GPI-Ps identificadas em C. gattii (CNBG) e C. neoformans var grubii (CNAG) com nova descrição funcional sugerida*33

RESUMO

O Complexo *Cryptococcus neoformans* compreende as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. Estas leveduras basidiomicéticas causam criptococose em indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes, respectivamente. Particularmente em fungos, proteínas ancoradas por Glicosilfosfatidilinositol (GPI-Ps) estão envolvidas em muitos aspectos da interação patógeno-hospedeiro, como adesão e invasão das células hospedeiras, modulação e evasão da resposta imune do hospedeiro e patogênese. Este trabalho tem por objetivo identificar proteínas ancoradas por GPI nas espécies do Complexo *C. neoformans* por análise *in silico* de suas sequências genômicas. Para isso, foi utilizado um conjunto de algoritmos para predição de GPI-Ps nas linhagens *C. neoformans* var. *grubii* (H99) e *C. gattii* (R265) através da análise de 6967 e 6210 seqüências de ORFs traduzidas, respectivamente. A classificação de uma proteína como sendo uma GPI-P seguiu o seguinte critério: a seqüência de aminoácidos apresentou (i) um peptídeo sinal de secreção N-terminal; (ii) uma seqüência sinal de ancoramento por GPI na extremidade C-terminal; (iii) ausência de domínios transmembrana internos. As seqüências foram obtidas no banco de dados genômicos do Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org/science/data>). Neste estudo, 63 proteínas foram identificadas como GPI-Ps em *C. neoformans* var. *grubii* (H99) e 47 em *C. gattii* (R265). Fosfolipase B1, Endo-1,3 β -glucanases, Quitina desacetilases e Glioxaloxidasas foram encontradas em ambas as espécies. Estas proteínas já foram previamente descritas como GPI-Ps, demonstrando que a metodologia empregada no estudo mostrou-se eficiente. As proteínas identificadas puderam ser, de maneira geral categorizadas funcionalmente, destacando-se aquelas envolvidas na biogênese e remodelamento da parede celular. Aproximadamente 70% das proteínas identificadas em ambas espécies não têm função conhecida, algumas tendo homólogas com outras proteínas fúngicas e outras sendo únicas da espécie. A identificação dessas proteínas será de extrema importância na elucidação de aspectos relacionados à patogênese e servirá de modelo para outras doenças causadas por fungos.

ABSTRACT

The Cryptococcus neoformans species Complex includes the Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii yeasts. These basidiomycete yeasts can cause disease in immunocompromised and immunocompetent patients, respectively. Notably in fungus, glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins (GPI-Ps) are involved in different aspects of host-pathogen interaction, such as host cells adhesion and invasion, host immune response modulation and evasion and pathogenesis. In this work, we performed a systematic, genome-wide in silico identification of C. neoformans complex species GPI-Ps. A set of prediction tools was applied for the screening of 6967 and 6210 predicted protein sequences from C. neoformans var. grubii (H99 strain) and C. gattii (R265 strain), respectively. The sequences were retrieved from the Broad Institute genome database (<http://www.broadinstitute.org/science/data>). The identification of putative GPI-Ps was based on the following criteria: i) the presence of an N-terminal signal peptide for secretion; ii) the presence of a C-terminal GPI-attachment site and iii) absence of internal transmembrane domains. A total of 63 putative GPI-Ps were identified in C. neoformans var. grubii and 47 proteins were identified as GPI-P in C. gattii. Proteins previously described as GPI-anchored, such as Phospholipase B1, Endo-1,3- β -glucanases, Chitin deacetylases and Glyoxaloxidases were identified in both species C. neoformans var. grubii and C. gattii. The proteins identified could be classified in several functional categories, especially those involved in cell wall biogenesis and remodeling. About 70% of the GPI-Ps identified have unknown functions. Many of the putative GPI-Ps do not display conserved domains, but some possess fungal orthologs homologs while others are currently unique to specie. The GPI-P identification in Cryptococcus neoformans species complex is of extreme importance for elucidating aspects related to the pathogenesis and will serve as a model for others fungal diseases.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

*A levedura *Cryptococcus neoformans* foi identificada como patógeno humano em 1984, sendo a primeira descrição atribuída a dois médicos alemães, Otto Busse e Abraham Buschke. A partir desta data, a recuperação do microrganismo a partir de lesões de humanos e animais, e seu isolamento do ambiente estabeleceram o potencial patogênico e a capacidade de vida livre, respectivamente (Casadevall & Perfect, 1998).*

Por séculos, infecções fúngicas foram associadas a infecções superficiais (dermatomicoses), sendo que graves infecções fúngicas sistêmicas eram muito raras. Contudo, nas últimas três décadas, tem ocorrido um drástico aumento deste tipo de infecção fúngica, devido ao aumento da população de indivíduos imunocomprometidos, resultante, principalmente, de transplante de órgãos, tratamentos de combate ao câncer que ocasionam a imunossupressão do paciente e aumento da incidência da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (Lin, 2009). Por exemplo, um recente relato do Centro para Controle de Doenças e Prevenção (CDC) mostrou que a meningite criptocócica é responsável pela morte de 624.000 pessoas por ano (Park et al., 2008).

A associação entre a infecção com o vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e o aumento na susceptibilidade à infecção criptocócica disseminada foi logo notada em pacientes com debilidade imunológica (Lin & Heitman, 2006). A meningite criptocócica tornou-se a infecção fúngica mais comum do sistema

nervoso central (SNC), sendo o principal fator que contribui para a mortalidade em pacientes com AIDS (Del Valle & Pina-Oviedo, 2006; Pukkila-Worley & Mylonakis, 2008).

O complexo de espécies *Cryptococcus neoformans* compreende as leveduras basidiomicéticas *C. neoformans* e *C. gattii*. Estes patógenos podem infectar o SNC, pulmões e pele do hospedeiro. Atualmente, a espécie *C. neoformans* é classificada em duas variedades e três sorotipos, baseando-se em diferenças antigênicas de sua cápsula polissacarídica. Estas são, *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos D e AD) (Sorrell et al., 1996) e *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) (Franzot et al., 1999). No ano de 2002, *C. gattii* (sorotipos B e C) foi definitivamente reconhecido como espécie, deixando de ser considerado apenas uma terceira variedade de *C. neoformans* (Kwon-Chung et al., 2002).

C. neoformans e *C. gattii* diferem quanto à epidemiologia e quanto a seus nichos ecológicos (Bovers et al. 2008). *C. neoformans* var. *grubii* e var. *neoformans* são cosmopolitas e considerados patógenos oportunistas, pois acometem preferencialmente indivíduos imunocomprometidos. As principais fontes ambientais desta espécie são solos e excretas de aves, principalmente pombos (*Columba livia*) (Lin & Heitman, 2006). Por outro lado, *C. gattii* infecta primariamente indivíduos imunocompetentes. Esta espécie era considerada restrita a regiões de clima tropical e subtropical associada a troncos de eucaliptos, desde o achado inicial de *C. gattii* em *Eucalyptus camaldulensis* (Bovers et al., 2008). Contudo, esta espécie tem surgido como um importante patógeno na região Noroeste da América do Norte, região de clima temperado. Primeiramente, *C. gattii* foi reconhecido em uma epidemia na ilha de Vancouver, no Canadá (Kidd

et al., 2004; Duncan et al.; 2006). Recentemente, registros mostram que a epidemia de criptococose causada por C. gattii vem se disseminando pela região oeste dos Estados Unidos da América (Datta et al., 2009a; Dixit et al., 2009; Datta et al., 2009).

O aspecto clínico da infecção causada por C. gattii difere da causada por C. neoformans. A doença causada por C. gattii é caracterizada por uma alta incidência de massas inflamatórias (criptococomas) nos pulmões e cérebro, aumento na morbidade neurológica e resposta retardada ao tratamento antifúngico (Sorrel, 2001). Entretanto, a doença decorrente da infecção por C. neoformans é associada a lesões pulmonares e cerebrais as quais se apresentam como infiltrados mais difusos. C. neoformans var. grubii é responsável por 99% das infecções criptocócicas em pacientes HIV-positivos (Bovers et al. 2008).

Acredita-se que a infecção humana seja adquirida pela inalação de propágulos do fungo, podendo ser basidiósporos da sua fase sexual ou células dessecadas dispersas no ambiente, os quais alojam-se no trato respiratório do hospedeiro. As infecções pulmonares por C. neoformans e C. gattii são brandas e sem graves manifestações. Neste ambiente, o fungo pode ser eficientemente fagocitado e destruído pelas células de defesa imunológica, ou sobreviver e se multiplicar no interior de macrófagos. Uma vez no pulmão, o fungo pode se disseminar pela via hematogênica. Ao atingir o sistema nervoso central, o fungo inicia a fase crônica da doença, vindo a desenvolver quadros de meningoencefalite ou meningite (Figura 1; Lin & Heitman, 2006).

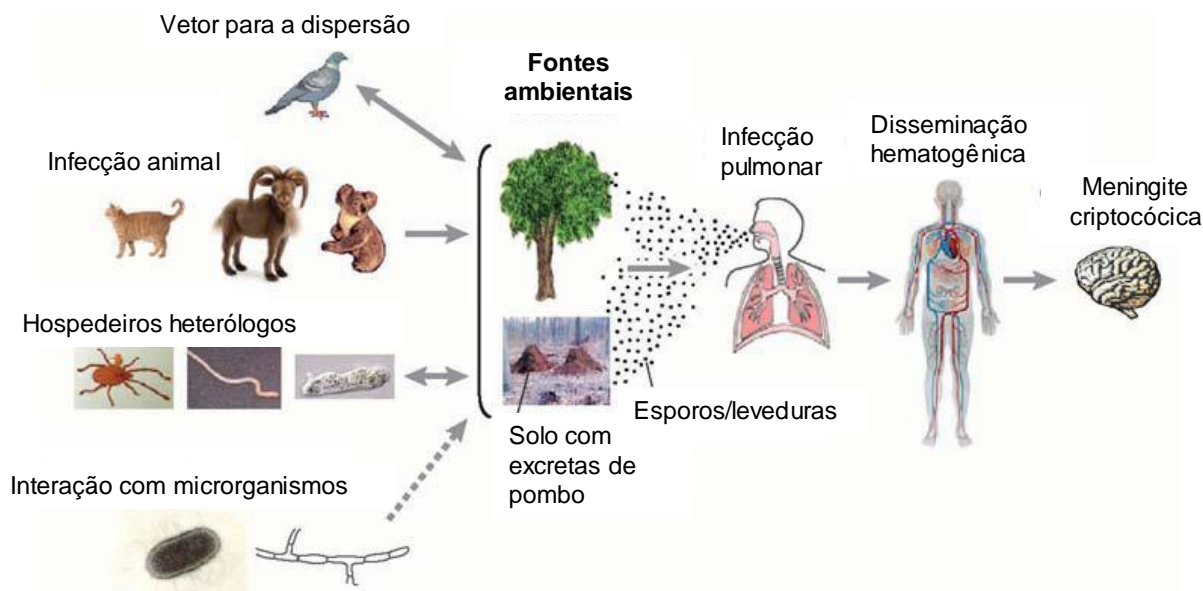


Figura 1. Ciclo de infecção de *C. neoformans*. O fungo sobrevive em solos, geralmente contaminados com excretas de pombos, e árvores. Aves, principalmente pombos, devem ser as responsáveis pela dispersão mundial da levedura. O fungo pode infectar diversos animais. Ele também pode sobreviver em predadores ambientais como insetos, vermes e ameba. Ainda, o fungo pode interagir com outros microrganismos como bactérias e outros fungos. *C. neoformans* estabelece a infecção pulmonar através da inalação de seus esporos ou células dessecadas presentes em fontes ambientais. Quando o hospedeiro se torna imunocomprometido, o fungo pode assumir sua forma latente e atingir o sistema nervoso central. Adaptado de Lin & Heitman, 2006.

C. neoformans é isolado tanto de pacientes quanto do ambiente na forma leveduriforme. Entretanto, esse microrganismo pode sofrer uma transição dimórfica, estabelecendo o desenvolvimento de hifas (forma filamentosa) por duas rotas de diferenciação distintas: Ciclo sexual (mating) e frutificação monocariótica (Figura 2). Ambas as vias levam à produção de possíveis partículas infecciosas, os basidiósporos. O mating de *C. neoformans* envolve a fusão de células haplóides de mating types opostos, α e a , para a produção de filamentos dicarióticos que, posteriormente, sofrem meiose, levando à produção dos basidiósporos. Durante o processo de frutificação monocariótica, células de um

mesmo mating sofrem diploidização em resposta à limitação de nutrientes, ocorrendo, no final do processo, a formação de basidiósporos (Idnurm et al., 2005; Xiaorong, 2009).

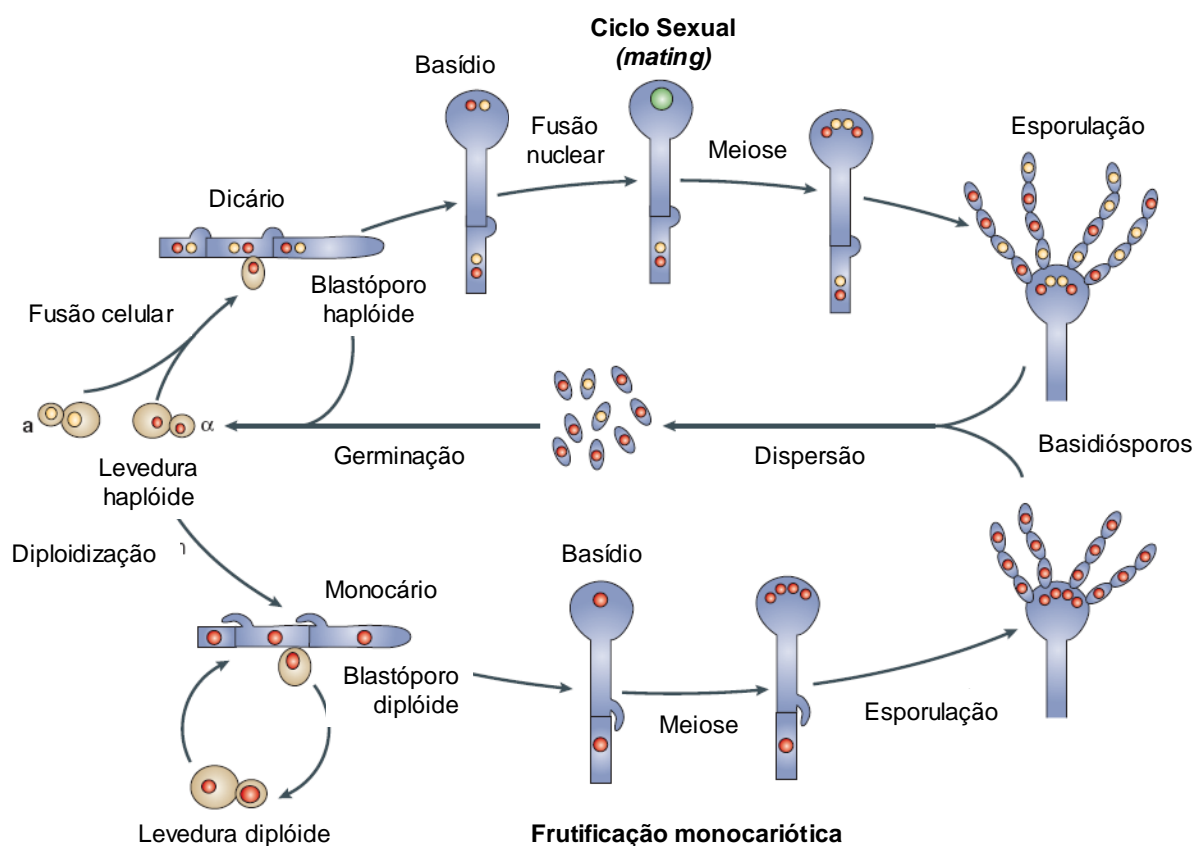


Figura 2. **Ciclo de vida de *C. neoformans*.** Durante o ciclo sexual da levedura (mating) ocorre fusão de células leveduriformes haplóides de mating types opostos α e **a**. Formam-se hifas dicarióticas, as quais sofrem um processo meiótico de divisão celular, resultando na produção de basidiósporos. Durante o processo de frutificação monocariótica, células de um mesmo mating type fusionam-se, formando hifas diplóides, e, após a meiose, basidiósporos haplóides são produzidos. Estas partículas, oriundas de ambos os processos, dispersam-se no ambiente, e, em condições ideais de germinação, dão origem a leveduras haplóides. Adaptado de Idnurm et al., 2005.

1.2 As espécies do Complexo *C. neoformans* e Virulência

*Fungos patogênicos de origem ambiental apresentam um paradoxo, sendo virulentos em animais, mas sem necessitarem de um hospedeiro animal para sua replicação ou sobrevivência. No fungo patogênico humano *C. neoformans*, a capacidade para a virulência em animais deve ter se originado de pressões ambientais seletivas impostas por organismos predadores, como amebas e nematódeos. Muitos fatores de virulência em *C. neoformans* parecem ter capacidades “duplas” que conferem vantagens de sobrevivência tanto em hospedeiros animais quanto no ambiente (Casadevall et al., 2003).*

*A virulência das espécies do Complexo *C. neoformans* é um processo complexo. Em *C. neoformans* e *C. gattii* fatores de virulência bem estabelecidos incluem (i) a produção de uma cápsula polissacarídica (Figura 3A), (ii) a habilidade de sintetizar o pigmento antioxidante melanina (Figura 3B), e (iii) a habilidade de sobreviver e proliferar a 37 °C (Idnurm et al., 2005).*

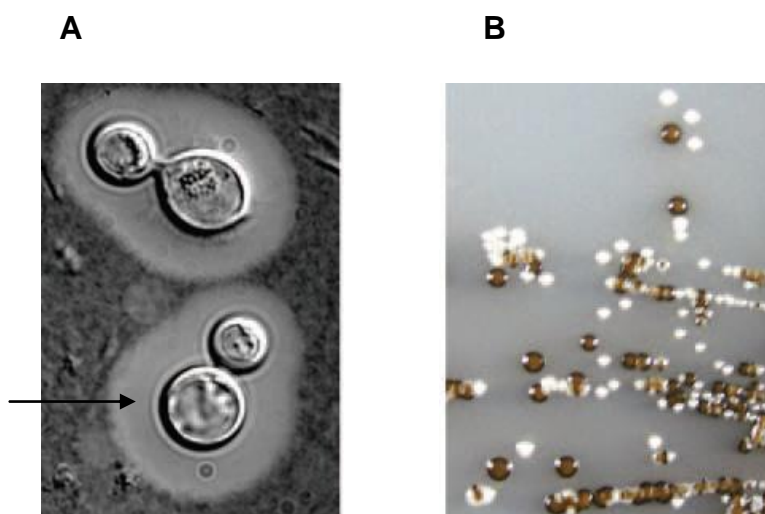


Figura 3. Fatores de virulência em *C. neoformans*. (A) Coloração de células da levedura com tinta da China, evidenciando a presença de cápsula polissacarídica (indicada pela seta). (B) Colônias de *C. neoformans* (marrons) em contraste com colônias de *Candida albicans* (brancas),

destacando a produção do pigmento melanina, em meio de cultura contendo compostos fenólicos. Adaptado de Idnurm et al., 2005.

1.2.1 A cápsula polissacarídica

A característica mais proeminente das leveduras do Complexo C. neoformans é a presença de uma elaborada cápsula polissacarídica, uma estrutura complexa que é necessária para a virulência (Figura 3A; Zaragoza et al., 2009).

Estudos iniciais a respeito da natureza da cápsula mostraram que esta é composta, majoritariamente, por dois polissacarídeos: glicuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), juntamente com manoproteínas. GXM compreende cerca de 90% da massa da cápsula (McFadden et al., 2006). Linhagens mutantes que não possuem GXM na superfície são avirulentos, uma observação central na caracterização deste polímero como o principal fator de virulência de C. neoformans (Chang & Kwon-Chung, 1994). O polissacarídeo GXM é sintetizado intracelularmente, mais especificamente no Complexo de golgi (Yoneda & Doering, 2006). O tráfego de GXM para a superfície celular aparentemente envolve o transporte por secreção de vesículas contendo o polissacarídeo, as quais atravessam a parede celular, liberando seu conteúdo no espaço extracelular (Rodrigues et al., 2007).

A cápsula está presente em isolados ambientais, envolvendo a parede celular fúngica, protegendo-a contra desidratação. Em geral, esta estrutura atua como uma barreira física que interfere no processo de fagocitose por macrófagos

e contribui para a virulência através de múltiplos efeitos deletérios na resposta imune, os quais facilitam a propagação do fungo em tecidos e, finalmente, levam o hospedeiro ao óbito (Zaragoza et al., 2009).

1.2.2 Síntese de melanina

A melanina (Figura 3B) desempenha papel na virulência por ser um mecanismo de proteção contra a ação de radicais livres tóxicos produzidos pelo sistema imune hospedeiro (Idnurm et al., 2005). Esse pigmento hidrofóbico carregado negativamente é formado pela oxidação de compostos fenólicos e/ou indólicos. A melanina é formada pela polimerização oxidativa de compostos dihidroxifenólicos exógenos via atividade de uma fenoxidase (lacase) (Gomes & Nosanchuk, 2003). O fungo capta precursores dopaminérgicos do ambiente extracelular, incluindo o L- enantiômero de 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA). A ação da enzima lacase associada à membrana catalisa a formação de melanina pela oxidação de L-DOPA, iniciando uma série de reações presumivelmente espontâneas que, por fim, levam à polimerização do pigmento e sua consequente deposição entre a membrana e a parede celular (Zhu & Williamson, 2004; Eisenman et al., 2007). A enzima lacase em *C. neoformans* é codificada pelo gene *LAC1* e exerce acentuado impacto na virulência deste microorganismo. Em modelo de infecção experimental, linhagens mutantes para este gene mostraram-se menos virulentas quando comparadas a linhagens selvagens (Salas et al., 1996). Uma segunda lacase em *C. neoformans* já foi descrita, codificada pelo gene *LAC2*. Esta enzima também participa da síntese de melanina, porém seu

nível de transcrição basal é significativamente menor em relação à transcrição de LAC1 (Zhu & Williamson, 2004). Os dois genes para lacase, LAC1 e LAC2, são regulados pelas vias de sinalização ativadas por AMPc, controlando, assim, a produção de melanina (Pukkila-Worley et al., 2005). A disrupção de outros componentes da via de sinalização mediada por AMPc, como o gene CAC1, que codifica uma adenilil ciclase, e o gene GPA1, o qual codifica a subunidade G α da proteína G associada a receptor, resulta em alteração na produção de melanina e consequente redução ou perda de virulência em *C. neoformans* (Kozubowski et al., 2009).

1.2.3 Desenvolvimento à 37°C

C. neoformans e *C. gattii* conseguem se desenvolver à temperatura corporal de mamíferos (37°C – 39°C), possibilitando o estabelecimento da doença no interior do hospedeiro (Idnurm et al., 2005).

Dentre as 38 espécies do gênero *Cryptococcus*, somente as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são capazes de estabelecer desenvolvimento normal acima de 30 °C (Perfect, 2006). Os genes regulados pela temperatura já identificados em *C. neoformans* atuam em uma variedade de processos biológicos. Dentre eles, estão precursores da glioxal oxidase, precursor da lacase, fosfatidilinositol 3-kinase, endopeptidase, transportador Cálcio/Ferro e quitina sintase 2. Todos estes genes mostraram expressão significativamente aumentada durante o crescimento a 37 °C. Representam, dessa forma, uma fração de potenciais alvos para inibição do desenvolvimento desta levedura no hospedeiro (Rosa e Silva et al., 2008).

Análises gênicas identificaram outros fatores que têm sido associados à virulência em C. neoformans, incluindo a produção de Urease (Cox et al., 2000) e a atividade de fosfolipases (Cox et al., 2001; Chayakulkeeree et al., 2008). A identificação de fatores de virulência fúngicos e o reconhecimento de novos mecanismos de patogênese podem levar ao desenvolvimento de novas terapias antifúngicas eficientes.

1.3 Os genomas das espécies do Complexo C. neoformans

Atualmente, os genomas de diferentes linhagens das espécies do Complexo C. neoformans estão sequenciados. O primeiro genoma totalmente sequenciado e anotado foi o de duas linhagens de C. neoformans var. neoformans (JEC21 e B-3501A) (Loftus et al, 2005). Outros projetos de sequenciamento disponíveis incluem o da linhagem H99 de C. neoformans var. grubii

(http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans/MultiHome.html), uma linhagem ambiental de C. gattii sorotipo B (WM276) (<http://www.bcgsc.ca/project/cryptococcus/summary/view>), e o da linhagem R265 de C. gattii sorotipo B – linhagem clínica hipervirulenta isolada da recente epidemia de Vancouver-Canadá (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans_b/MultiHome.html). A disponibilidade de seqüências genômicas completas de diferentes linhagens de C. neoformans e C. gattii, juntamente com os recentes avanços na compreensão de fatores únicos da interação Cryptococcus-

hospedeiro, tem contribuído grandemente para o entendimento deste fungo patogênico a nível molecular, com a identificação de possíveis alvos para o desenvolvimento de drogas e vacinas.

1.4 Proteínas ancoradas por Glicosilfosfatidilinositol (GPI-Ps)

Aproximadamente 1% de todas as proteínas codificadas por genomas eucarióticos, ou aproximadamente 10-20% de todas as proteínas de membrana que entram na via secretória após serem direcionadas para o retículo endoplasmático (RE), são pós-traducionalmente modificadas na sua região C-terminal por glicosilfosfatidilinositol (GPI), um glicofosfolípídeo complexo que tem por função ancorar proteínas na superfície celular (Orlean & Menon, 2007; Paulick & Bertozzi, 2008).

As proteínas acopladas à âncora de GPI (GPI-Ps) possuem características estruturais comuns: um peptídeo sinal N-terminal, que direciona a proteína para o RE, e um segundo domínio hidrofóbico na porção C-terminal, que, dentro do lúmen do RE, é clivado e substituído pela âncora de GPI no resíduo de aminoácido designado sítio ômega (ω) (Ikezawa, 2002). A região do sítio ω é composta por aminoácidos pequenos ($\omega+1$, $\omega+2$) para ajustarem-se ao sítio catalítico da protease transamidase (Eisenhaber et al., 2004).

1.4.1 Estrutura e biossíntese das âncoras de GPI

Diferentemente de simples modificações lipídicas, a âncora de GPI possui uma estrutura complexa (Paulick & Bertozzi, 2008). Análises detalhadas das estruturas de âncoras de GPI de mamíferos, protozoários e leveduras revelaram que elas possuem uma estrutura central conservada (Figura 4, Richard & Plaine, 2007). Esta estrutura central consiste de um grupo lipídico (servindo como âncora para a ligação à membrana plasmática), um grupo inositol, um grupo glicosamina (GlcN), três grupos de manose e, por fim, um grupo fosfoetanolamina (EtNP), que conectará a âncora de GPI à extremidade C-terminal de uma proteína através de uma ligação amida (Figura 4). Esta estrutura de GPI pode ser modificada de forma variável com cadeias laterais, tais como EtNPs e carboidratos acessórios (Figura 4; Richard & Plaine, 2007).

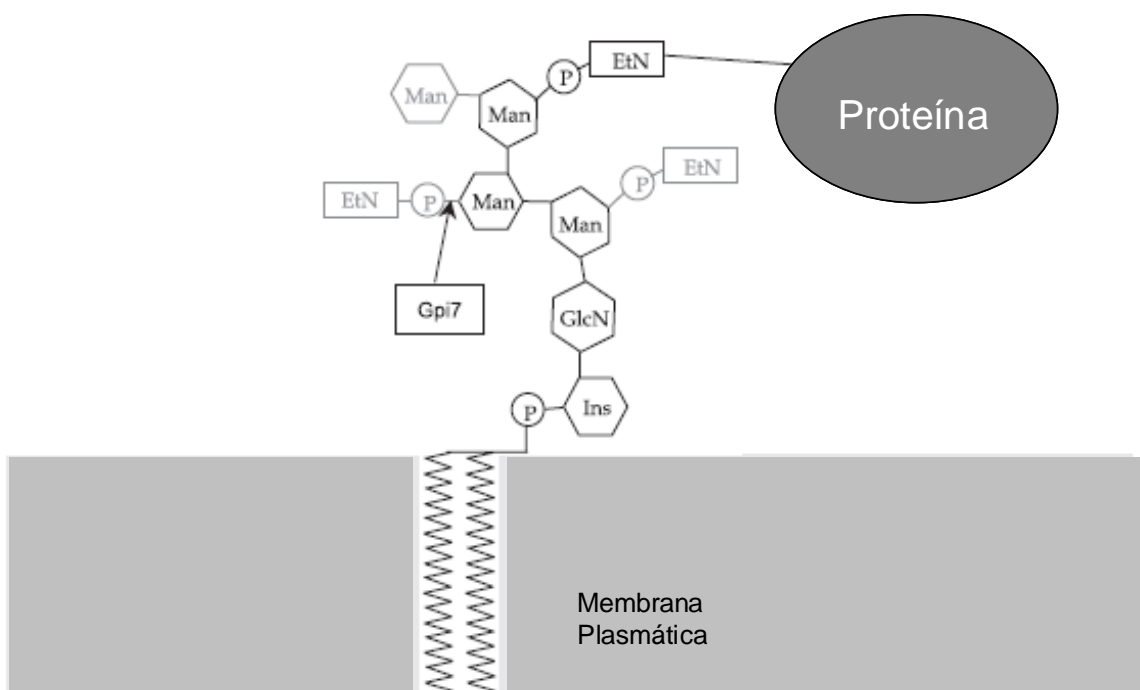


Figura 4 . Estrutura central de uma âncora de GPI. A estrutura básica encontrada em algumas células eucarióticas é representada em preto. Os grupos adicionais em cinza ilustram as cadeias laterais acrescentadas na âncora de GPI em Saccharomyces cerevisiae (cadeias laterais são específicas para cada organismo). EtN, etanolamina; GlcN, glicosamina; M, manose; I, inositol; P, fosfato. Adaptado de Richard & Plaine (2007).

Dependendo da proteína e espécie de origem, a âncora lipídica do anel fosfoinositol pode ser um diacilglicerol, um alquilacilglicerol, ou uma ceramida. As espécies lipídicas variam em comprimento, variando de 14 a 28 carbonos e podem ser saturadas ou insaturadas (McConville et al., 1993). Muitas âncoras GPI também contêm um ácido graxo adicional (um ácido palmítico), no 2-hidroxil do anel inositol. Entretanto, a conexão entre a diversidade estrutural da âncora de GPI e função é pouco compreendida (Paulick & Bertozzi, 2008).

Diferentemente de domínios hidrofóbicos transmembrana de proteínas que invadem a bicamada lipídica, âncoras GPI penetram somente dentro de uma camada da membrana. Esta característica permite a associação de GPI-Ps com rafts lipídicas – microdomínios de membrana ricos em colesterol e esfingolipídeos – as quais acredita-se, desempenham importante papel no tráfego de membranas e sinalização celular (Orlean & Menon, 2007).

A âncora de GPI é amplamente distribuída entre organismos eucariotos, incluindo protozoários, fungos, plantas, insetos e mamíferos (Paulick & Bertozzi, 2008). Dentre os vertebrados, GPI-Ps têm sido identificadas em todos os principais tipos celulares e tecidos (Nosjean et al., 1997). Âncoras de GPI são essenciais para a viabilidade celular. Defeitos na biossíntese da âncora GPI são letais no desenvolvimento embrionário em mamíferos e condicionalmente letais em leveduras (Leidich et al., 1994, Kawagoe et al., 1996).

Os produtos de aproximadamente 25 genes estão diretamente envolvidos na via de biossíntese de GPI e seu acoplamento às proteínas, em *S. cerevisiae* e em mamíferos (Figura 5, Pittet & Conzelmann, 2007). Dentre eles, encontram-se fosfatidilinositol-glicanas (PIGs), dolicol-fosfato manoses (DPMs) e transamidases. Na primeira etapa, ocorre a transferência de N-acetilglicosamina (GlcNAc) ao fosfatidilinositol (PI) gerando GlcNAc-PI. Esta reação é catalisada por um complexo enzimático constituído por seis proteínas (PIG-A, PIG-C, PIG-H, GPI1, PIG-P, e DPM2). No passo seguinte, GlcNAc-PI é de-N-acetilada produzindo Glc-PI. Estas duas etapas ocorrem na face citoplasmática do RE. Glc-PI é movido para o lúmen do RE, onde ele é inositol-acilado, inositol-manosilado e modificado por Etn-P. As manoses são derivadas de DPMs, sintetizados a partir de dolicol-fosfato e GDP-manose em uma reação catalisada por DPM1 na face citoplasmática do RE. Por fim, o grupo Etn-P da última manose é ligado à região C-terminal de proteínas contendo a sequência sinal para GPI (sítio ω). Esta reação é catalisada por um complexo enzimático chamado GPI-transamidase, que é formado por quatro componentes essenciais, GAA1 (junção à âncora de GPI 1), PIG-S, PIG-T e PIG-U, mais a subunidade catalítica de GPI8. As GPI-Ps partem do RE e são transportadas para a membrana plasmática via Golgi (Orlean & Menon, 2007; Pittet & Conzelmann, 2007).

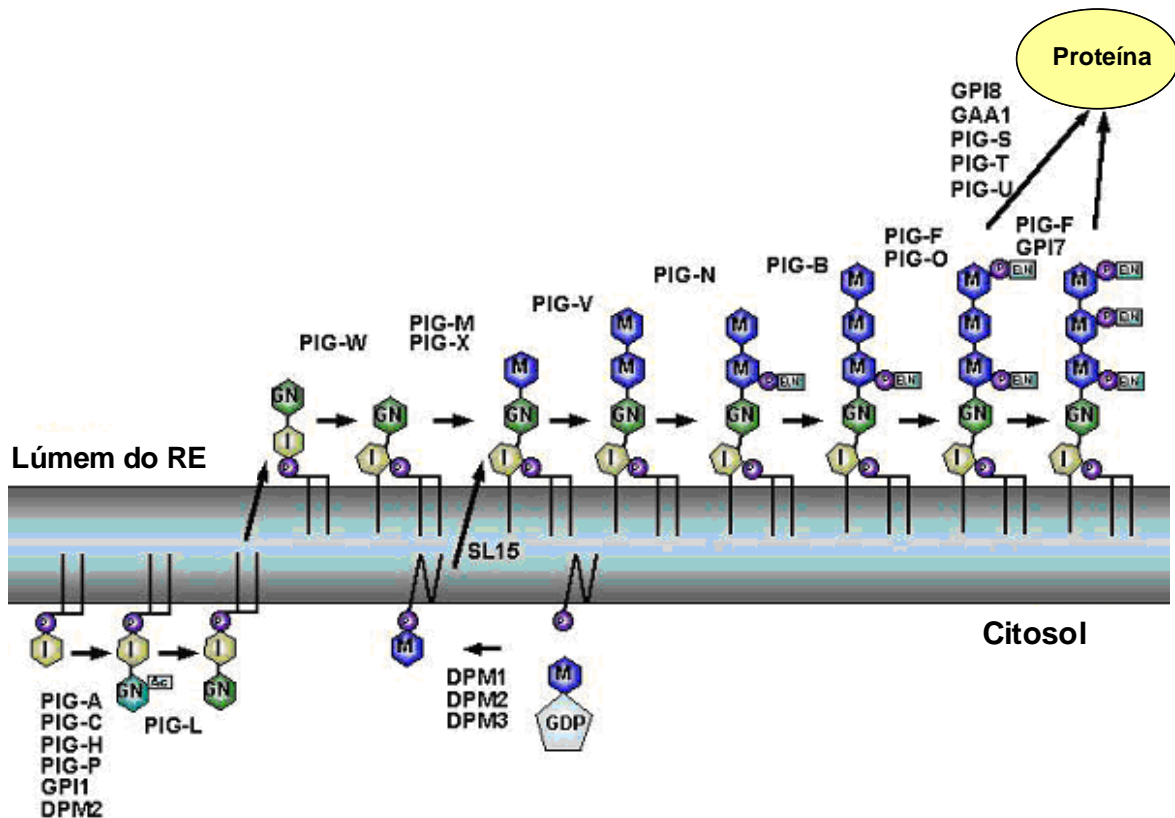


Figura 5. Principal via de biossíntese de GPI em leveduras. (1) Adição de N-acetilglicosamina e fosfatidilinositol. (2) Retirada do grupo N-acetil do grupo N-acetilglicosamina. (3) Acilação do Inositol no RE. (4) Adição da primeira manose (Man1) à glicosamina. (5) Adição da segunda manose (Man2); (6) Adição de Etanolamina-fosfato à Man1; (7) Adição da terceira manose (Man3); (8) Adição de Etanolamina-fosfato à Man3; (9) Adição de Etanolamina-fosfato à Man2; (10) Ligação da âncora de GPI à proteína. (A) Síntese do substrato Dolicol-fosfato-manose. Símbolos: Ac, N-acetil; EtN, etanolamina; GN, glicosamina; I, Inositol; M, manose; P, fosfato; RE, Retículo endoplasmático. Adaptado de http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/men-eki-huzen/pages/gpisyntesis_e.html.

A clivagem da âncora GPI de sua proteína associada é processada por fosfolipases, tais como PI-PLC e fosfolipase D. A susceptibilidade da âncora GPI para tal clivagem tem sido sugerida como um mecanismo para a regulação seletiva de GPI-Ps. A liberação mediada por fosfolipase é rápida e pode ser usada pela célula para secretar determinadas GPI-Ps em um momento específico. Âncoras GPI com um ácido graxo extra ligado ao motivo inositol são

resistentes à fosfolipase, permitindo à célula – ou proteína – controle específico sobre a liberação de GPI-Ps. A clivagem da âncora GPI de uma proteína pode também ser usada para romper a adesão entre células. Alternativamente, produtos lançados a partir da clivagem de uma GPI-P, como o fosfolipídeo inositol, estariam envolvidos nas vias de transdução de sinal ou comunicação celular. (Paulick & Bertozzi, 2008).

1.4.2 Análise e predição *in silico* de GPI-Ps

A demonstração bioquímica direta de que uma proteína possui uma âncora de GPI não é simples. Evidências bioquímicas preliminares para a ancoragem por GPI podem ser obtidas através de métodos indiretos, por exemplo: (i) através da demonstração de perda de hidrofobicidade após tratamento com fosfolipase PI-específica (PI-PLC); (ii) pela perda de localização na superfície após mutação sítio dirigida de um possível sítio ω ; ou (iii) pela demonstração de uma associação covalente, resistente a pH alcalino, sensível à glicanase com a parede celular, para a qual a adição de uma âncora de GPI é um pré-requisito (Pittet & Conzelmann 2007). Demonstrações mais diretas de ancoramento por GPI são obtidas através de: (i) purificação de GPI-Ps e análise de sua região C-terminal; e (ii) por métodos químicos e físicos, por exemplo, análise por espectrometria de massas. Estas técnicas proteômicas vêm permitindo o aumento no número de GPI-Ps identificadas em frações de células de mamíferos e leveduras (Yin et al., 2005, Elortza et al., 2006).

Recentemente, a verificação bioquímica de possíveis modificações por GPI tem sido substituída por análises *in silico* utilizando-se algoritmos preditivos, os quais identificam GPI-Ps com significativa confiança (Caro et al., 1997; Hamada et al., 1998; de Groot et al., 2003; Eisenhaber et al., 2004). A presença de um acoplamento à GPI é inferido se a sequência de aminoácidos de uma proteína contém (i) um sinal de secreção hidrofóbico N-terminal que direciona a proteína ao RE e (ii) uma sequência sinal C-terminal de ancoramento à GPI. Proteínas de leveduras ainda contêm regiões ricas em aminoácidos Serina e Treonina (Orlean & Menon, 2007). Embora essa região rica em Serina e Treonina seja frequentemente encontrada em GPI-Ps, sua presença mostrou-se não ser um pré-requisito absoluto para que proteínas sejam acopladas à GPI e, portanto, não é uma característica utilizada como critério de seleção de GPI-Ps (Caro et al., 1997). Através da comparação entre proteínas com a sequência sinal C-terminal de ancoramento à GPI conhecidas, obteve-se uma sequência consenso que inclui os seguintes elementos: (i) uma região ligadora de aproximadamente 11 resíduos ($\omega-11$ - $\omega-1$) para a conexão da proteína com a cavidade catalítica do Complexo transamidase; (ii) uma região de 4 resíduos, preferencialmente pequenos ($\omega-1$ - $\omega+2$), encaixando o sítio catalítico e incluindo o sítio ω para a clivagem do pró-peptídeo e acoplamento da âncora de GPI; (iii) uma região espaçadora moderadamente polar ($\omega+3$ - $\omega+9$); e (iv) uma extremidade hidrofóbica começando em $\omega+9$ ou $\omega+10$ até a o final da extremidade C-terminal (Eisenhaber et al., 1998). É importante observar que todos esses quatro elementos são necessários para o reconhecimento pelo Complexo transamidase; uma única

substituição de um resíduo pode mudar uma GPI-P para uma versão não-ancorada da proteína (Eisenhaber et al., 1999).

Atualmente, diversas ferramentas de bioinformática para a predição de ancoramento por GPI estão disponíveis. Estas ferramentas diferem entre si pelo método computacional adotado para desenvolver o algoritmo. O preditor Big-PI é baseado em uma função que leva em consideração as características da sequência C-terminal descritas anteriormente (Eisenhaber et al., 1999; Eisenhaber et al., 2004). Outra ferramenta, GPI-SOM (Fankhauser & Mäser, 2005), utiliza-se de mapas de auto-organização (Self-organizing Maps) e predição do peptídeo sinal com o software SignalP (Bendtsen et al., 2004), alcançando uma melhor performance do que os dois primeiros métodos descritos. O preditor FragAnchor é capaz de reconhecer um alto número de GPI-Ps com baixa taxa de falsos positivos. Isto é alcançado por um procedimento de duas etapas, que inclui análise pelo modelo de Rede Neural (Neural Network) e Modelo de Hidden Markov (HMM) que trabalham de maneira independente um do outro (Poisson et al., 2007). Contudo, diferentemente dos outros métodos, FragAnchor não é capaz de prever a posição do sítio ω . Por fim, a ferramenta PredGPI utiliza-se de um método que combina um HMM e um SVM (Support Vector Machine), capaz de prever de forma eficiente a presença da sequência sinal para ancoramento por GPI e a posição do sítio ω (Pierleoni et al., 2008).

Através da aplicação destas ferramentas de bioinformática, listas globais de GPI-Ps têm sido obtidas pela análise *in silico* do genoma de fungos. Dentre estudos já realizados, está a identificação de GPI-Ps em *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*,

Schizosaccharomyces pombe, *C. glabrata*, *Paracoccidioides brasiliensis* (Eisenhaber et al., 2004; Weig et al., 2004; Castro et al., 2005).

A análise *in silico* do genoma de *C. neoformans var. neoformans* identificou aproximadamente cinquenta proteínas modificadas com GPI (Levitz & Specht, 2006). Destas, vinte e nove foram identificadas em análises proteômicas de polipeptídeos da parede celular lançados por digestão de protease ou β -glicanase (Eigenheer et al., 2007). O tratamento com β -glicanases libera proteínas que se mantêm covalentemente ligadas a glicanas através de um remanescente da âncora de GPI. Isto foi demonstrado para uma fosfolipase B1, importante para a integridade da parede celular e virulência em *C. neoformans* (Cox et al., 2001). O tratamento de células com β 1,3-glicanase liberou as proteínas modificadas com β 1,6-glicana. A fosfolipase naturalmente secretada foi similarmente modificada, sugerindo a ligação à parede celular como um estágio intermediário na secreção da proteína (Siafakas et al., 2007). Outra proteína GPI-ancorada em *C. neoformans* identificada foi a homóloga de *S. cerevisiae* Gas1p. Esta proteína remodela β 1,3-glicanas, consistente com sua localização na parede celular (Levitz & Specht, 2006).

Virulência e proteínas presentes na superfície celular são frequentemente correlacionadas em patógenos eucariotos e procariotos. Neste contexto, tem-se demonstrado o envolvimento de diversas GPI-Ps em muitos aspectos da interação patógeno-hospedeiro, como adesão e invasão das células hospedeiras, modulação e evasão da resposta imune do hospedeiro, e patogênese.

Tendo em vista o papel de GPI-Ps na virulência de fungos patogênicos, e com a atual disponibilidade de informações genômicas de diferentes linhagens

das espécies do Complexo C. neoformans, faz-se necessário analisar, de forma comparativa, estas diferentes espécies quanto à composição de GPI-Ps.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol nas espécies do Complexo Cryptococcus neoformans através da análise in silico de suas seqüências genômicas.

2.2 Objetivos específicos

(i) Executar um algoritmo para a predição de GPI-Ps em diferentes linhagens das espécies do Complexo C. neoformans;

(ii) Comparar a composição das GPI-Ps identificadas entre C. neoformans var. grubii e C. gattii.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Identificação *in silico* de GPI-Ps

Foram analisadas 6.967 e 6.210 sequências de Open Read Frames (ORFs) traduzidas de *C. neoformans* var. *grubii* (linhagem H99) e *C. gattii* (linhagem R265), respectivamente. As sequências foram obtidas no banco de dados genômicos do Broad Institute of MIT and Harvard (<http://www.broadinstitute.org/science/data>).

A classificação de uma proteína como sendo uma GPI-P baseou-se no seguinte critério: a sequência de aminoácidos apresentou (i) um peptídeo sinal de secreção N-terminal que encaminha a proteína para o RE, (ii) uma sequência sinal de ancoramento por GPI na extremidade C-terminal, e (iii) ausência de domínios transmembrana internos (Figura 6).

A presença do peptídeo sinal N-terminal foi investigada utilizando-se a ferramenta SignalP versão 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Nielsen et al., 1997; Bendtsen et al., 2004). O SignalP versão 3.0 utiliza dois métodos de predição de peptídeo sinal, um baseado em Redes Neurais (SignalP-NN) e outro baseado em HMM (SignalP-HMM). Somente proteínas preditas para possuírem peptídeo sinal pelos dois métodos foram selecionadas para análise quanto à presença de sinal de ancoramento à GPI.

Três ferramentas para a predição de GPI-Ps foram utilizadas: GPI-SOM (<http://gpi.unibe.ch/>) (Fankhauser & Maser, 2005), FragAnchor (<http://navet.ics.hawaii.edu/~fraganchor/NNHMM/NNHMM.html>) (Poisson et al.,

2007) e *PredGPI* (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi>) (Pirleoni et al., 2008). As sequências foram analisadas de forma independente pelos três programas. Somente aquelas cujo sinal de ancoramento por GPI foi identificado pelos três programas seguiram para análise quanto à presença de domínios transmembrana internos.

A presença de regiões hidrofóbicas internas na sequência de aminoácidos indica que a proteína em análise possui domínios transmembrana, desqualificando-a, portanto, para ser uma GPI-P. Para averiguar a presença desses sítios, utilizou-se o *TMHMM 2.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Krogh et al., 2001) e o *PSORT II* (<http://www.psort.org/>) (Nakai & Horton., 1999). Somente foram considerados domínios transmembrana internos aqueles que não se localizaram entre os primeiros 50 e os últimos 50 aminoácidos da sequência peptídica.

A predição da localização celular da proteína também foi realizada utilizando-se *PSORTII*.

3.2 Comparação entre a composição de GPI-Ps presentes em *C. neoformans* var. *grubii* e *C. gattii*.

Utilizando *BLASTp* (*Basic Local Alignment Search Tool for Proteins*), realizou-se uma busca cruzada entre as GPI-Ps identificadas em *C. neoformans* var *grubii* e *C. gattii*. As GPI-Ps que apresentaram identidade maior ou igual a 30% e e-

value menor ou igual a $1.0e-10$ foram agrupadas, evidenciando GPI-Ps exclusivas em cada uma das espécies ou presentes em ambas.

Buscas por similaridade de sequência utilizando-se BLASTp na plataforma do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1997) e no Pfam database (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) (Bateman et al., 2002) foram realizadas para a predição funcional de proteínas.

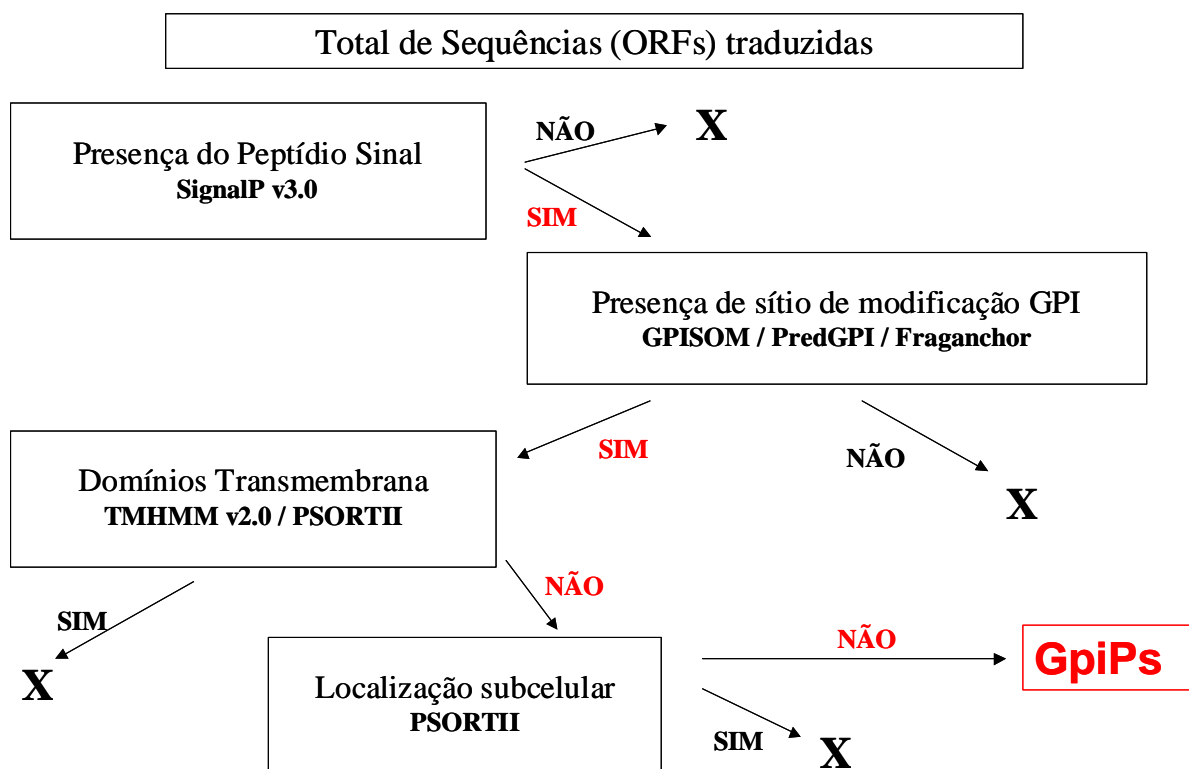


Figura 6. Fluxograma da metodologia utilizada para identificação de GPI-Ps nas espécies do Complexo *C. neoformans*.

4. RESULTADOS

Na identificação *in silico* de GPI-Ps, a partir das 6.967 ORFs preditas de *C. neoformans* var. *grubii* (linhagem H99) e das 6.210 ORFs preditas de *C. gattii* (linhagem R265), a presença de peptídeo sinal N-terminal, como primeira etapa de seleção, reduziu drasticamente o número de sequências a serem investigadas, restando, aproximadamente, 7,5 % das proteínas iniciais de ambas espécies. Ao final da análise pelas três ferramentas de predição de ancoramento por GPI (PredGPI, GPI-SOM e FragAnchor), restaram somente 63 e 47 candidatas a GPI-Ps em *C. neoformans* var. *grubii* (H99) e *C. gattii* (R265), respectivamente. Nenhuma dessas candidatas apresentou domínios transmembrana internos ou sinal de localização subcelular, consistindo neste, portanto, o número final de GPI-Ps identificadas para cada espécie (Tabela 1).

Tabela 1. Etapas do algoritmo empregado para identificação de GPI-Ps nas espécies do Complexo *C. neoformans*.

	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	<i>C. gattii</i>
Total de ORFs traduzidas analisadas	6967	6210
Presença de peptídeo sinal	524 (7.52%)	461 (7.42%)
Presença de sinal de ancoramento por GPI	63 (0.9%)	47 (0.75%)
Presença de domínios transmembrana	0	0
Localização subcelular	0	0
Possíveis Proteínas GPI-ancoradas identificadas	63	47

Através da busca cruzada entre GPI-Ps identificadas em *C. neoformans* var. *grubii* e em *C. gattii*, pôde-se agrupá-las por categorias de proteínas ortólogas. Assim, verificou-se que a maioria das GPI-Ps identificadas é compartilhada entre as duas espécies (Tabela 2). Entretanto, para uma GPI-P de *C. gattii* não foi

encontrada qualquer proteína ortóloga equivalente dentre as GPI-Ps de *C. neoformans var. grubii*. Isto é, essa GPI-P de *C. gattii* possui uma ortóloga em *C. neoformans var. grubii*, mas essa proteína ortóloga não foi identificada como uma GPI-P pelas ferramentas *in silico* anteriormente acima citadas (Tabela 3). De forma semelhante, 12 GPI-Ps de *C. neoformans var. grubii* não possuem ortólogas equivalentes dentre as GPI-Ps de *C. gattii* (Tabela 3). Por fim, para outras 2 GPI-Ps de *C. neoformans var. grubii* não foram encontradas ortólogas em *C. gattii* (Tabela 3).

Dentre as 63 GPI-Ps identificadas em *C. neoformans var. grubii*, 42 proteínas estão anotadas sem qualquer informação a respeito de sua função. Em *C. gattii*, 33 das 47 GPI-Ps identificadas não possuem descrição a respeito de sua função. Estas GPI-Ps com função desconhecida são descritas como proteína predita, proteína hipotética ou hipotética conservada.

Para investigar em maior detalhe a função das GPI-Ps identificadas, realizou-se uma busca por proteínas ortólogas na plataforma do NCBI e por domínios conservados no Pfam database. Com esta análise, obtiveram-se informações importantes a respeito das GPI-Ps, e uma re-anotação com descrição funcional foi sugerida para estas GPI-Ps (Tabela 4). Por exemplo, o grupo formado pelas 4 endopeptidases identificadas em *C. gattii* e pelas 3 endopeptidases identificadas em *C. neoformans var. grubii* pertence à família Asp de proteases aspárticas. Em outros casos, diferentes GPI-Ps anotadas como hipotéticas possuem domínios conservados importantes, que podem ajudar na elucidação de sua função biológica (Tabela 4).

Tabela 2. Grupos de ortólogas das GPI-Ps identificadas em *C. gattii* (CNBG) e *C. neoformans* var. *grubii* (CNAG).

Linhagem	ID Broad Institute	Descrição^a	Tamanho (aa)	Sítio Clivagem Peptideo Sinal^b	Sítio Ômega^c
R265	CNAG_4798	Fosfolipase B	634	19/20	S-612
H99	CNAG_06085	Fosfolipase B	637	19/20	S-615
R265	CNAG_2759	Glicosideo Hidrolase	344	17/18	S-313
H99	CNAG_04291	Glicosideo Hidrolase	347	17/18	S-317
R265	CNAG_1017	Endopeptidase*	5581	15/16	S-554
	CNAG_1675	Endopeptidase*	497	13/14	S-468
	CNAG_1672	Endopeptidase*	491	18/19	S-465
	CNAG_2669	peptidase*	710	18/19	S-681
H99	CNAG_04635	Endopeptidase*	558	16/17	S-531
	CNAG_05872	Endopeptidase*	490	21/22	S-464
	CNAG_05869	Endopeptidase*	497	13/14	S-468
R265	CNAG_1499	Glioxal Oxidase	665	16/17	S-639
	CNAG_1811	Glioxal Oxidase	652	23/24	S-625
	CNAG_5182	Glioxal Oxidase	675	21/22	D-648
H99	CNAG_00407	Glioxal Oxidase	665	16/17	S-639
	CNAG_02030	Glioxal Oxidase	678	21/22	G-651
	CNAG_05731	Glioxal Oxidase	632	23/24	S-605
R265	CNAG_0806	Quitina Deacetilase	411	18/19	S-385
H99	CNAG_01239	Quitina Deacetilase	413	18/19	S-387
	CNAG_01230	Quitina Deacetilase	456	19/20	S-429
	CNAG_05799	Quitina Deacetilase	471	19/20	S-444

Tabela 2. Continuação

Linhagem	ID Broad Institute	Descrição^a	Tamanho (aa)	Sítio Clivagem Peptídeo Sinal^b	Sítio Ômega^c
R265	CNBG_5332	Alfa-amilase	533	21/22	G-507
H99	CNAG_02189	Alfa-amilase	533	21/22	G-507
	CNAG_00122	Alfa-amilase	562	25/26	Q-533
R265	CNBG_2195	Alginato Liase	397	23/24	S-365
H99	CNAG_03413	Alginato Liase	397	23/24	D-374
R265	CNBG_4403	Glicosídeo Hidrolase da Família 16	369	21/22	S-340
	CNBG_5804	Hipotética conservada*	386	19/20	S-361
	CNBG_5802	Hipotética conservada*	394	19/20	G-362
H99	CNAG_05458	Endo-1,3(4)-beta-glicanase	374	21/22	S-342
	CNAG_04876	Endo-1,3(4)-beta-glicanase	388	20/21	S-363
R265	CNBG_4742	Glicoproteína*	384	19/20	S-352
	CNBG_5735	Hipotética conservada*	416	19/20	N-389
H99	CNAG_00776	Manoproteína imunoreativa MP88	379	22/23	S-353
	CNAG_05312	Hipotética conservada*	377	19/20	N-350
	CNAG_06000	Glicoproteína*	400	19/20	S-368
R265	CNBG_0228*	Hipotética conservada	477	21/22	Y-453
H99	CNAG_00373	Hipotética conservada	530	21/22	S-499
R265	CNBG_1370	Glicosídeo Hidrolase da Família 16*	379	25/26	N-353
H99	CNAG_00596	UTR2P	372	24/25	N-347

Tabela 2. Continuação

Linhagem	ID Broad Institute	Descrição^a	Tamanho (aa)	Sítio Clivagem Peptídeo Sinal^b	Sítio Ômega^c
	CNBG_2582	<i>Hipotética conservada</i>	258	24/25	D-226
R265	CNBG_0310	<i>Proteína predita</i>	201	17/18	S-174
	CNBG_4430	<i>Proteína predita</i>	229	18/19	S-203
	CNBG_1576	<i>Proteína predita</i>	312	25/26	S-282
H99	CNAG_00261	<i>Hipotética conservada</i>	202	17/18	S-170
	CNAG_01272	<i>Proteína hipotética</i>	240	18/19	S-215
	CNAG_05424	<i>Hipotética conservada</i>	227	18/19	S-201
	CNAG_03782	<i>Hipotética conservada</i>	192	17/18	S-164
	CNAG_04486	<i>Hipotética conservada</i>	257	24/25	S-227
	CNAG_03858	<i>Hipotética conservada</i>	307	25/26	S-282
R265	CNBG_0421	<i>Hipotética conservada</i>	325	26/27	S-299
H99	CNAG_00137	<i>Hipotética conservada</i>	298	26/27	S-272
R265	CNBG_1575	<i>Proteína predita</i>	308	20/21	A-276
H99	CNAG_03857	<i>Proteína hipotética</i>	254	20/21	S-222
	CNBG_2381	<i>Hipotética conservada</i>	203	18/19	S-171
R265	CNBG_2705	<i>Hipotética conservada</i>	183	18/19	S-158
	CNBG_2366	<i>Hipotética conservada</i>	222	19/20	S-196
H99	CNAG_03204	<i>Hipotética conservada</i>	202	18/19	T-177
	CNAG_03223	<i>Proteína hipotética</i>	222	19/20	S-196
R265	CNBG_3416	<i>Hipotética conservada</i>	161	20/21	S-132
H99	CNAG_02759	<i>Hipotética conservada</i>	181	20/21	S-151

Tabela 2. Continuação

Linagem	ID Broad Institute	Descrição ^a	Tamanho (aa)	Sítio Clivagem Peptideo Sinal ^b	Sítio Ômega ^c
R265	CNBG_4278	Hipotética conservada	412	18/19	S-383
H99	CNAG_05595	Hipotética conservada	417	18/19	S-388
R265	CNBG_4538	Hipotética conservada*	309	18/19	S-286
H99	CNAG_05156	Hipotética conservada*	309	18/19	S-286
R265	CNBG_4727	Hipotética conservada*	427	19/20	S-400
H99	CNAG_04944	Hipotética conservada*	423	19/20	S-396
R265	CNBG_4814	Hipotética conservada*	654	28/29	S-630
H99	CNAG_06104	Hipotética conservada*	666	28/29	S-642
R265	CNBG_5038	Proteína Predita	226	22/23	S-195
H99	CNAG_06422	Hipotética conservada	226	22/23	S-195
R265	CNBG_5209	Proteína Predita	306	22/23	S-274
H99	CNAG_02060	Hipotética conservada	311	22/23	S-280
R265	CNBG_5294	Hipotética conservada*	432	21/22	N-407
H99	CNAG_02146	Hipotética conservada*	438	21/22	N-408
R265	CNBG_6180	Proteína predita	252	19/20	S-222
H99	CNAG_06795	Hipotética conservada	243	19/20	S-213
R265	CNBG_0269	Proteína predita	273	19/20	Y-247
H99	CNAG_00301	Hipotética conservada	273	19/20	Y-247
R265	CNBG_3565	Proteína predita	195	20/21	G-169
H99	CNAG_02921	Hipotética conservada	199	20/21	G-173
R265	CNBG_1435	Hipotética conservada	539	26/27	N-512
H99	CNAG_00476	Hipotética conservada	537	26/27	N-510

Tabela 2. Continuação

Linhagem	ID Broad Institute	Descrição^a	Tamanho (aa)	Sítio Clivagem Peptídeo Sinal^b	Sítio Ômega^c
R265	CNMG_1654	Hipotética conservada	375	16/17	I-349
H99	CNAG_05893	Hipotética conservada	370	16/17	V-344
R265	CNMG_5392	Proteína predita	199	17/18	L-173
H99	CNAG_04091	Hipotética conservada	198	16/17	L-174
R265	CNMG_0214	Hipotética conservada	354	23/24	V-324
H99	CNAG_00359	Hipotética conservada	352	23/24	I-327
R265	CNMG_1549	Proteína predita	174	18/19	P-148
H99	CNAG_03831	Hipotética conservada	179	18/19	P-153
R265	CNMG_3989	Hipotética conservada	378	20/21	G-346
H99	CNAG_07638	Hipotética conservada	360	20/21	G-328
R265	CNMG_2562	Hipotética conservada	321	28/29	D-295
H99	CNAG_04506	Hipotética conservada	343	28/29	D-313

^a Descrição como anotada no Broad Institute.

* GPI-*Ps* com nova descrição funcional sugerida (Ver Tabela 4).

^b sítio de clivagem do peptídeo sinal predito pelo SignalP v. 3.0.

^c Sítio ômega predito pelo PredGPI.

Tabela 3. GPI-Ps identificadas em *C. neoformans* var. *grubii* (CNAG) e *C. gattii* (CNBG) que não agruparam por homologia de sequência.

ID Broad Institute	Descrição ^a	Tamanho (aa)	Sítio Clivagem Peptideo sinal	Sítio Ômega ^c
<i>GPI-Ps de C. gattii</i> que não possuem equivalentes nas GPI-Ps de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>				
CNAG_1813	Hipotética conservada	187	19/20	S-155
<i>GPI-Ps de C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> que não possuem equivalentes nas GPI-Ps de <i>C. gattii</i>				
CNAG_06501	1,3-beta-glicosiltransferase	565	19/20	S-533
CNAG_03716	Hipotética conservada	306	22/23	S-274
CNAG_01725	proteína predita	161	21/22	S-134
CNAG_02775	Hipotética conservada	219	19/20	S-190
CNAG_01986	Hipotética conservada	255	19/20	S-226
CNAG_07856	Hipotética conservada*	552	19/20	S-529
CNAG_05915	Proteína hipotética	632	18/19	N-607
CNAG_06396	Proteína hipotética	204	19/20	Q-181
CNAG_07176	Hipotética conservada	291	15/16	S-265
CNAG_01995	Hipotética conservada	226	19/20	P-201
CNAG_02207	Hipotética conservada*	339	15/16	A-307
CNAG_01275	Hipotética conservada	496	21/22	G-470
<i>GPI-Ps de C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> que não possuem ortólogas em <i>C. gattii</i>				
CNAG_04171	Hipotética conservada*	252	21/22	W-221
CNAG_07784	Hipotética conservada	136	18/19	V-112

^a Descrição como anotada no Broad Institute.

* GPI-Ps com nova descrição funcional sugerida (Ver Tabela 4).

^b sítio de clivagem do peptídeo sinal predito pelo SignalP v. 3.0.

^c Sítio ômega predito pelo PredGPI.

Diversos estudos mostram a diversidade funcional de GPI-Ps. As GPI-Ps preditas nas espécies do Complexo *C. neoformans* podem ser enzimas, antígenos de superfície, possíveis moléculas de adesão, ou possuir função na biogênese e remodelamento da parede celular (Tabela 2). Foram encontradas fosfolipases, proteases aspárticas, glioxal oxidases, manoproteínas imunoreativas, quitina deacetilases, alginato liases e diversas glicosídeo hidrolases, como alfa-amilases e endo-1,3(4)-beta-glicanases.

Tabela 4. GPI-Ps identificadas em *C. gattii* (CNBG) e *C. neoformans* var *grubii* (CNAG) com nova descrição funcional sugerida.

ID Broad Institute	Descrição	Organismo relacionado ID GenBank (e-value) Identidade (%) ^a	Domínio conservado (GenBank) e-value ^b	Pfam ^c e-value
CNBG_1017	Aspartil protease	<i>Filobasidiella neoformans</i> ABG37636 (0.0) 449/496 (91%)	<i>Pepsin-like aspartic proteases</i> 4.08e-45	Asp(PF00026) 5.9e-72
CNBG_1675	Aspartil protease	<i>Laccaria bicolor</i> XP_001883786.1 (5.0e-72) 160/402 (40%)	<i>Pepsin-like aspartic proteases</i> 4.03e-62	Asp(PF00026) 1.1e-72
CNBG_1672	Aspartil protease	<i>Laccaria bicolor</i> XP_001883786.1 (3.0e-88) 199/459 (44%)	<i>Pepsin-like aspartic proteases</i> 6.08e-55	Asp(PF00026) 1.8e-71
CNBG_2669	Aspartil protease	<i>Laccaria bicolor</i> XP_001880746.1 (5.0e-34) 86/211 (41%)	<i>Pepsin-like aspartic proteases</i> 2.13e-15	Asp(PF00026) 1.6e-16
CNBG_5804	Glicosídeo hidrolase família 16 (beta-1,3-glucanase)	<i>Schizophyllum commune</i> XP_003033735.1 (3.0e-72) 147/307 (48%)	<i>GH16_MLG1_glucanase</i> 4.18e-79	-
CNBG_5802	Glicosídeo hidrolase família 16 (beta-1,3-glucanase)	<i>Schizophyllum commune</i> XP_003033735.1 (8.0e-73) 145/331 (44%)	<i>GH16_MLG1_glucanase</i> 2.68e-76	<i>Glyco_hydro_16</i> (PF00722) 4.1e-06

Tabela 4. Continuação.

ID Broad Institute	Descrição	Organismo relacionado ID GenBank (e-value) Identidade (%) ^a	Domínio conservado (GenBank) e-value ^b	Pfam ^c e-value
CNBG_4742	<i>immunoreactive mannoprotein MP88</i>	<i>C. neoformans var. neoformans JEC21</i> XP_567104.1 (8.0e-78) 153/292 (53%)	-	
CNBG_5735	<i>immunoreactive mannoprotein MP88</i>	<i>C. neoformans var. neoformans JEC21</i> XP_567104.1 (7.0e-29) 100/271 (37%)	-	-
CNBG_0228	<i>glucan 1,3-beta-glucosidase</i>	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i> XP_002172425.1 (8E-38) 113/342 (34%)	<i>BglC (endoglucanase)</i> 7.70e-18	-
CNBG_1370	UTR2	<i>Coprinopsis cinerea okayama</i> XP_001832292.1 (8.0e-86) 156/362 (44%)	<i>GH16_GPI_glucanosyltransferase</i> 6.83e-50	<i>Glyco_hydro_16</i> (PF00722) 3.2e-40
CNBG_4538	<i>Protein containing CFEM domain</i>	-	-	<i>CFEM domain</i> (PF05730) 4.8e-11
CNBG_4727	<i>glycoside hydrolase family 105 protein</i>	<i>Schizophyllum commune</i> XP_003032782.1 (9.0e-74) 166/391 (43%)	-	<i>Glyco_hydro_88</i> (PF07470) 7.1e-16

Tabela 4. Continuação

ID Broad Institute	Descrição	Organismo relacionado ID GenBank (e-value) Identidade (%) ^a	Domínio conservado (GenBank) e-value ^b	Pfam ^c e-value
CNBG_4814	<i>glycoside hydrolase family 79 protein</i>	<i>Laccaria bicolor</i> XP_001879946.1 (1.0e-107) 250/642 (39%)	-	-
CNBG_5294	Putative Fasciclin	<i>Coprinopsis cinerea okayama</i> XP_001942181.1 (5.0e-08) 70/270 (26%)	<i>Fasciclin</i> 2.51e-12	<i>Fasciclin (PF02469)</i> 6.5e-15
CNAG_04635	aspartyl protease	<i>Filobasidiella neoformans</i> ABG37636.1 (0.0) 441/496 (89%)	<i>Pepsin-like aspartic proteases</i> 1.16e-46	<i>Asp(PF00026)</i> 9.5e-62
CNAG_05872	aspartyl protease	<i>Laccaria bicolor</i> XP_001883786.1 (1.0e-86) 185/424 (44%)	<i>Pepsin-like aspartic proteases</i> 3.27e-56	<i>Asp(PF00026)</i> 3.1e-70
CNAG_05869	aspartyl protease	<i>Laccaria bicolor</i> XP_001883786.1 (9.0e-71) 172/444 (39%)	<i>Pepsin-like aspartic proteases</i> 7.64e-63	<i>Asp(PF00026)</i> 5.9e-72
CNAG_05312	immunoreactive mannoprotein MP88	<i>C. neoformans var. neoformans</i> JEC21 XP_567104.1 87/256 (34%)	-	-

Tabela 4. Continuação

ID Broad Institute	Descrição	Organismo relacionado	Domínio conservado (GenBank) e-value ^b	Pfam ^c e-value
		ID GenBank (e-value) Identidade (%) ^a		
CNAG_06000	<i>immunoreactive mannoprotein MP88</i>	<i>C. neoformans var. neoformans</i> JEC21 XP_567104.1 (7.0e-22) 154/274 (57%)	-	-
CNAG_05156	<i>Protein containing CFEM domain</i>	-	-	CFEM (PF05730) 9.2e-11
CNAG_04944	<i>glycoside hydrolase family 105 protein</i>	<i>Schizophyllum commune</i> XP_003032782.1 (1.0e-77) 186/430 (44%)	-	Glyco_hydro_88 (PF07470) 8.7e-16
CNAG_06104	<i>glycoside hydrolase family 79 protein</i>	<i>Laccaria bicolor</i> XP_001879946.1 (4.0e-121) 265/640 (42%),	-	-
CNAG_02146	<i>Putative Fasciclin</i>	-	Fasciclin 7.98e-11	Fasciclin (PF02469) 3.0e-13
CNAG_07856	<i>Putative sulfotransferase</i>	<i>Streptomyces sp</i> ADF80705.1 (2.0e-50) 150/456 (33%)	Arylsulfotrans 1.15e-13	Arylsulfotrans (PF05935) 1.2e-12

Tabela 4. Continuação

ID Broad Institute	Descrição	Organismo relacionado	Domínio conservado (GenBank)	Pfam ^c
		ID GenBank (e-value) Identidade (%) ^a	e-value ^b	e-value
CNAG_02207	<i>glycosyl hydrolase 53 domain-containing protein</i>	<i>Coprinopsis cinerea okayama</i> XP_001829384.1 (8.0e-28) 84/242 (35%)	<i>Glyco_hydro_cc</i> [pfam11790] 4.28e-56	<i>Glyco_hydro_cc</i> (PF11790) 9.3e-68
CNAG_04171	<i>cell wall organization and biogenesis-related protein</i>	<i>C. neoformans var. neoformans</i> JEC21 XP_572917.1 226/252 (90%)	<i>Rot1</i> [pfam10681] 1.18e-73	<i>Rot1</i> (PF10681) 1.3e-70

^a Comparação realizada por BLASTp no GenBank database (não-reduntante).

^b Domínios encontrados por BLASTp no GenBank database (não-reduntante).

^c Domínios conservados encontrados no Pfam database.

5. DISCUSSÃO

A maior disponibilidade de genomas seqüenciados tem proporcionado nova fonte de informação para estudos genômicos comparativos em larga-escala a respeito de GPI-Ps. Na última década, diversos estudos aumentaram nosso entendimento a cerca do número e funções desse grupo de proteínas.

*Em geral, o número de GPI-Ps identificadas por métodos computacionais varia de acordo com a espécie e com o algoritmo empregado para a sua identificação. Por exemplo, três diferentes listas de GPI-Ps em *C. albicans* foram publicadas (de Groot et al., 2003; Eisenhaber et al., 2004; Garcera et al., 2003), apresentando diferentes números de possíveis GPI-Ps (102, 104 e 169, respectivamente). Em uma revisão mais recente, Richard e Plaine (2007) publicaram uma lista que apresentou 115 possíveis GPI-Ps em *C. albicans*, sendo que 70 delas foram comuns às três listas publicadas anteriores. A quantidade de GPI-Ps para outros fungos, identificadas por análise *in silico*, mostrou-se diversa. Foram identificadas 58 GPI-Ps em *S. cerevisiae*, 87 em *Neurospora crassa*, 74 em *Aspergillus nidulans*, e 28 em *S. pombe* (Eisenhaber et al., 2004). Exceto por *S. pombe*, a composição de GPI-Ps nestes fungos representou aproximadamente 1% do proteoma total de cada espécie. Neste trabalho foram identificadas 47 GPI-Ps em *C. gattii* (R265) e 63 em *C. neoformans var. grubii* (H99). Esta diferença, pode ser reflexo do maior número de ORFs disponíveis para análise em *C. neoformans var. grubii*. Dessa perspectiva, o número de GPI-Ps aqui identificadas está de acordo com o esperado para fungos.*

Os modelos computacionais de predição de moléculas ou estruturas de biologia molecular, inclusive para identificação de GPI-Ps, podem levar a conclusões equivocadas, devido às limitações intrínsecas de cada algoritmo e/ou às especificidades de cada organismo biológico sobre o qual se trabalha. Com o intuito de tornar a busca por GPI-Ps mais estridente, foram aplicados três programas de predição de forma independente um do outro. Esta metodologia prioriza pela redução da identificação de GPI-Ps falso-positivas, mas pode não contribuir para os casos de GPI-Ps falso-negativas. Dentre os programas utilizados, o Fraganchor e o PredGPI são capazes de identificar corretamente cerca de 90 % de GPI-Ps. Este valor de cobertura é maior do que o obtido com o terceiro programa, o GPI-SOM, com o qual obtêm-se aproximadamente 82 % de cobertura. Ainda, a taxa de GPI-Ps falso-positivas identificadas é de 1,7 % para o GPI-SOM e inferior a 0,4 % para o PredGPI e o Fraganchor (Poisson et al., 2007; Pirleoni et al., 2008). Portanto, o emprego destes três softwares torna bastante confiável a identificação de GPI-Ps, fazendo com que a predição deste grupo de proteínas de superfície sirva como uma primeira etapa para sua caracterização e estudo funcional.

De forma semelhante ao que ocorre com GPI-Ps de outros fungos, a vasta maioria das proteínas identificadas nas espécies do Complexo *C. neoformans* possui função desconhecida. Da totalidade de GPI-Ps, aproximadamente 65% em *C. neoformans* var. *grubii* e 70% em *C. gattii* não possuem informação funcional. Em *Neurospora crassa* e *Aspergillus nidulans*, a fração de GPI-Ps com funções desconhecidas são próximas a 60% (Einsenhaver et al., 2004). Esse subconjunto de GPI-Ps desperta interesse, visto que, devido à sua localização na superfície

celular, a investigação funcional destas proteínas pode levar a novas e relevantes descobertas a respeito dos mecanismos de interação parasito-hospedeiro, importantes para a patogenicidade e virulência.

*As espécies *C. neoformans* e *C. gattii* diferem entre si em um aspecto fundamental relacionado ao estabelecimento da doença: *C. neoformans* é um patógeno oportunista, acometendo indivíduos imunocomprometidos, enquanto que *C. gattii* é um patógeno primário, podendo infectar indivíduos imunocompetentes (Idnurm et al., 2005). Em *C. neoformans* é conhecido o papel de manoproteínas com capacidade de estimular a resposta por células T do organismo infectado, evidenciando-se a capacidade de proteínas do patógeno expostas à superfície de interagirem com os componentes do sistema imunológico do hospedeiro (Huang et al., 2002). É importante observar que a manoproteína imunoreativa MP88 foi encontrada entre as GPI-Ps tanto em *C. neoformans* como em *C. gattii*. Entretanto, o fato de que nem todas as GPI-Ps são compartilhadas por ambas as espécies, levanta a hipótese de que, tal diferença na composição de GPI-Ps tenha influência sobre os mecanismos que levam às diferentes vias no padrão de infecção, que é dependente da condição imunológica do hospedeiro. A existência de GPI-Ps em uma das espécies cujas respectivas ortólogas não possuem ancoramento por GPI pode induzir distintos padrões de expressão dependentes de localização celular. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de que as proteínas que não foram identificadas como GPI-Ps são falso-negativas. Isto deve ser levado em consideração, principalmente, nos casos em que as GPI-Ps são altamente conservadas entre as espécies do Complexo *C. neoformans* e outras leveduras.*

As 2 GPI-Ps de *C. neoformans* var. *grubii* que não possuem ortólogas em *C. gattii* são proteínas hipotéticas conservadas (Tabela 3). Estas GPI-Ps merecem especial atenção por serem, aparentemente, únicas da espécie *C. neoformans*. Assim, seus papéis biológicos podem elucidar algum importante aspecto da patógenese das espécies do Complexo *C. neoformans*.

Dentre a totalidade de GPI-Ps identificadas, além do grande grupo de GPI-Ps com funções consideradas desconhecidas, outras três classes podem ser descritas (i) GPI-Ps com possíveis funções relacionadas ao remodelamento e biogênese da parede celular; (ii) GPI-Ps com possíveis funções relacionadas à adesão e interações célula-célula e (iii) GPI-Ps com funções enzimáticas diversas.

(i) **Biogênese e remodelamento da parede celular.** Em *C. neoformans*, a morfologia da parede celular difere entre sorotipos, e se mostra alterada após mutações e durante a infecção (Reese et al., 2007; Feldmesser et al., 2001). Um grande número das GPI-Ps identificadas pertence a alguma das famílias das glicosídeo hidrolases. Quitina-desacetilases, 1,3- β -glicosiltransferases, UTR2, e endo-1,3(4)- β -glicanases estão claramente relacionadas a algum aspecto da estrutura da parede celular.

Quitina-desacetilases realizam a conversão de quitina à quitosana, um componente da parede celular presente durante o crescimento vegetativo de *C. neoformans* necessário para a integridade da parede celular (Banks et al., 2005; Baker et al., 2007). As três quitina-desacetilases identificadas como GPI-Ps em *C. neoformans* var. *grubii* foram previamente descritas. Baker e colaboradores (2007) identificaram quatro quitina-desacetilases em *C. neoformans* (CDA1,

CDA2, CDA3, FPD1). As três CDAs são responsáveis pela totalidade da produção de quitosana durante o crescimento vegetativo, mas FPD1 possui função ainda não determinada (Baker et al., 2007). A análise do genoma de *C. gattii* mostra que esta espécie também possui quatro possíveis quitina-desacetilases. Entretanto, somente uma delas foi aqui identificada como GPI-ancorada (Tabela 2). É possível que, da mesma forma que FPD1 de *C. neoformans*, as outras três quitina-desacetilases de *C. gattii* sejam proteínas extracelulares secretadas e não GPI-ancoradas (Biondo et al., 2002).

As 1,3- β -glicosiltransferases, proteínas da família GAS/PHR, desempenham papel essencial na biogênese da parede celular, agindo como enzimas processadoras de β -1,3-glicanas (Hartland et al., 1996). Mutantes deletados para GAS1 em *S. cerevisiae* apresentam defeitos morfológicos e crescimento reduzido, e mutantes nulo para GAS2 e GAS4 produzem esporos inviáveis devido a defeitos severos na parede celular destas estruturas (Popolo et al., 1993; Ragni et al., 2007). Em *Aspergillus fumigatus* e em *C. albicans*, linhagens carregando mutações nos homólogos destes genes mostram uma grande redução na virulência em modelo animal de infecção (Mouyna et al., 2005; de Bernardis et al., 1998).

A classe de GPI-Ps envolvidas em modificações na estrutura ou composição da parede celular merece atenção especial, pois tais alterações podem modificar a superfície de epítomos reconhecidos pelo hospedeiro e, então, variar o nível de virulência.

(ii) **GPI-Ps com possíveis funções relacionadas à adesão e interações célula-célula.** *Dentre as GPI-Ps identificadas para C. neoformans var. grubii e C. gattii, algumas possivelmente estão envolvidas com funções de adesão celular. Isso se deve à presença de domínios conservados, como CFEM e o domínio FAS1, encontrados em GPI-Ps cuja função biológica é ainda desconhecida (Tabela 4). Em eucariotos, proteínas conhecidas como fasciclinas, contendo o domínio FAS1 estão envolvidas na adesão celular e podem assumir importante função na interação célula-célula entre patógeno e hospedeiro. Em Arabidopsis sp., foi encontrada uma família multigênica de fasciclinas, as arabinogalactanas (AGps). Existem 21 AGps em Arabidopsis, quatorze delas são preditas possuir ancoramento por GPI (Johnson et al., 2003). Recentemente, Song e colaboradores (2010) demonstraram que uma proteína de Paragonimus westermani – um trematódeo parasita que causa doenças inflamatórias pulmonares e infecções sistêmicas em mamíferos carnívoros – contendo o domínio FAS1 (Pwfas-I) é importante para adesão celular e disseminação, e determinaram que uma integrina atua como receptor funcional da Pwfas-I. A respeito do domínio CFEM, acredita-se que algumas proteínas fúngicas que contêm este domínio desempenham importante papel na patógenese. Em Magnaporthe grisea, proteínas contendo o domínio CFEM, PTH11 e AC11, são necessárias para o desenvolvimento do apressório, o qual é uma estrutura necessária para a infecção de plantas (Choi & Dean, 1997; DeZwaan et al., 1999). Em C. albicans, a proteína CSA1, contendo o domínio CFEM, é altamente expressa no estágio de micélio, forma diretamente envolvida na patógenese (Lamarre, et al., 2000). GPI-Ps contendo o domínio CFEM poderiam funcionar*

como receptores de superfície celular ou transdutores de sinal, ou ainda, como moléculas de adesão nas interações patógeno-hospedeiro (Kulkarni et al., 2003).

(iii) **GPI-Ps com funções enzimáticas diversas.** Uma enzima fosfolipase B foi identificada em cada espécie. Em *C. neoformans* e *C. gattii*, esta enzima já é bem estabelecida como sendo uma proteína GPI-ancorada localizada na membrana plasmática (Djordjevic et al., 2005; Latouche et al., 2002). Para as espécies do Complexo *C. neoformans*, a atividade desta enzima atua como fator de virulência. Linhagens mutantes para o gene *PLB1* apresentaram virulência atenuada em modelo de infecção por inalação em camundongos e em modelo de meningite em coelhos (Cox et al., 2001). Evidências sugerem que a ação de fosfolipases extracelulares implica a aderência do microrganismo a células hospedeiras e penetração dos tecidos hospedeiros. Por exemplo, em *C. albicans*, a deleção do gene *PLB1* resulta em uma significativa redução da capacidade do patógeno em atravessar a mucosa estomacal e se disseminar para o fígado pela via hematogênica (Leidich et al., 1998; Mukherjee et al., 2001).

Outro grupo de enzimas que provavelmente possui importante papel na virulência das espécies do Complexo *C. neoformans* são as proteases extracelulares. Em *C. neoformans* var. *grubii* foram identificadas 3 endopeptidases que pertencem à família de aspartil proteases, enquanto que em *C. gattii* foram identificadas 4 destas proteínas (Tabela 2). Proteases aspárticas já foram isoladas em *C. neoformans* sorotipo D pela análise proteômica da parede celular (Eigenheer et al., 2007). As duas proteases identificadas naquele estudo foram preditas como GPI-ancoradas. Proteases extracelulares devem estar

adaptadas a interações patógeno-hospedeiro, e isto foi demonstrado para C. albicans, onde linhagens mutantes para membros da família de aspartil proteases (Sap) apresentaram virulência atenuada de candidíase invasiva em modelo murino (Hube et al., 1997; Sanglard et al., 1997). Em outro trabalho, Albrecht e colaboradores (2006) demonstraram que a deleção de duas proteases GPI ancoradas – Sap9 e Sap10 – reduziu a habilidade de C. albicans em aderir a células epiteliais, diminuindo assim, a capacidade de invasão e o dano ao tecido hospedeiro.

O fato de que estas proteases são também importantes para o processo de adesão mostra que não se pode determinar, de forma definitiva, à qual das categorias funcionais aqui apresentadas as GPI-Ps estão inseridas. Potencialmente, todas as GPI-Ps das espécies do C. neoformans podem ser importantes para a virulência, estabelecimento e disseminação da doença, seja de forma direta ou indireta. Esta categorização somente auxilia na compreensão dos mecanismos celulares importantes para o processo de infecção e estabelecimento da doença, colocando em evidência o papel central das GPI-Ps nesses processos.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Através do método de análise computacional empregado obteve-se uma visão global das possíveis GPI-Ps presentes nas espécies do Complexo C. neoformans. O conjunto de GPI-Ps mostrou-se funcionalmente diverso. Estas proteínas parecem estar envolvidas direta ou indiretamente na virulência através de suas funções na adesão celular ou remodelamento e biogênese da parede celular.

Foram identificadas 63 GPI-Ps em C. neoformans var. grubii e 47 em C. gattii, sendo que aproximadamente 65% destas não possuem função conhecida. Estes dados estão de acordo com os encontrados em estudos semelhantes realizados com outras espécies de leveduras. O agrupamento das GPI-Ps por grupos de ortólogas presentes nas duas espécies, revelou que classes bem definidas de GPI-Ps são encontradas em ambas as espécies. Dentre estas, destacam-se enzimas como a fosfolipase B1, aspartil proteases, glioxaloxidasas, α -amilases, alginato liases endo-1,3 β -glucanases, quitina deacetilases e outras glicosil hidrolases. Estas proteínas já foram previamente descritas como GPIPs, demonstrando que a análise in silico empregada para a identificação de GPI-Ps mostrou-se eficiente.

Aparentemente, existem classes de proteínas que possuem localização celular diferente em cada espécie, assim como GPI-Ps únicas em C. neoformans var. grubii. Duas GPI-Ps (CNAG_04171 e CNAG_04171) identificadas nesta espécie não possuem ortólogas em C. gattii. O estudo funcional destas proteínas

pode elucidar alguns aspectos das diferenças existentes entre a infecção de C. neoformans e C. gattii.

Como perspectivas, espera-se validar os dados obtidos in silico através de estudos proteômicos comparativos entre as espécies do Complexo C. neoformans. A identificação e elucidação da função de novas GPI-Ps irá contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos utilizados por C. neoformans e C. gattii no estabelecimento da infecção.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRECHT, A., A. FELK, I. PICOVA, J. NAGLIK, M. SCHALLER, P. DE GROOT, D. MACCALLUM, F. ODDS, W. SCHÄFER, F. KLIS, M. MONOD, and B. HUBE. 2006. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem* 281: 688-694.
- ALTSCHUL, S., T. MADDEN, A. SCHÄFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER, and D. LIPMAN. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- BAKER, L., C. SPECHT, M. DONLIN, and J. LODGE. 2007. Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 6: 855-867.
- BANKS, I., C. SPECHT, M. DONLIN, K. GERIK, S. LEVITZ, and J. LODGE. 2005. A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 4: 1902-1912.
- BATEMAN, A., E. BIRNEY, L. CERRUTI, R. DURBIN, L. ETWILLER, S. EDDY, S. GRIFFITHS-JONES, K. HOWE, M. MARSHALL, and E. SONNHAMMER. 2002. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 30: 276-280.
- BENDTSEN, J., H. NIELSEN, G. VON HEIJNE, and S. BRUNAK. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340: 783-795.
- BIONDO, C., C. BENINATI, D. DELFINO, M. OGGIONI, G. MANCUSO, A. MIDIRI, M. BOMBACI, G. TOMASELLI, and G. TETI. 2002. Identification and cloning of a cryptococcal deacetylase that produces protective immune responses. *Infect Immun* 70: 2383-2391.
- BOVERS, M., F. HAGEN, and T. BOEKHOUT. 2008. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. *Rev Iberoam Micol* 25: S4-12.

- CARO, L., H. TETTELIN, J. VOSSEN, A. RAM, H. VAN DEN ENDE, and F. KLIS. 1997. In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 1477-1489.
- CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. 1998. *Cryptococcus neoformans*. Washington: American Society for Microbiology Press.
- CASADEVALL, A., J. STEENBERGEN, and J. NOSANCHUK. 2003. 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi--the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr Opin Microbiol* 6: 332-337.
- CASTRO, N. S., Z. MAIA, M. PEREIRA, and C. SOARES. 2005. Screening for glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet Mol Res* 4: 326-345.
- CHANG, Y., and K. KWON-CHUNG. 1994. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol* 14: 4912-4919.
- CHAYAKULKEEREE, M., T. SORRELL, A. SIAFAKAS, C. WILSON, N. PANTARAT, K. GERIK, R. BOADLE, and J. DJORDJEVIC. 2008. Role and mechanism of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in survival and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 69: 809-826.
- CHOI, W., and R. DEAN. 1997. The adenylate cyclase gene MAC1 of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development. *Plant Cell* 9: 1973-1983.
- COX, G., H. MCDADE, S. CHEN, S. TUCKER, M. GOTTFREDSSON, L. WRIGHT, T. SORRELL, S. LEIDICH, A. CASADEVALL, M. GHANNOUM, and J. PERFECT. 2001. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 39: 166-175.
- COX, G., J. MUKHERJEE, G. COLE, A. CASADEVALL, and J. PERFECT. 2000. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun* 68: 443-448.

DATTA, K., K. BARTLETT, R. BAER, E. BYRNES, E. GALANIS, J. HEITMAN, L. HOANG, M. LESLIE, L. MACDOUGALL, S. MAGILL, M. MORSHED, K. MARR, and C. G. W. G. O. T. P. NORTHWEST. 2009a. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States. *Emerg Infect Dis* 15: 1185-1191.

DATTA, K., K. BARTLETT, and K. MARR. 2009b. *Cryptococcus gattii*: Emergence in Western North America: Exploitation of a Novel Ecological Niche. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009: 176532.

DE BERNARDIS, F., F. MÜHLSCHLEGEL, A. CASSONE, and W. FONZI. 1998. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 66: 3317-3325.

DE GROOT, P., A. RAM, and F. KLIS. 2005. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet Biol* 42: 657-675.

DEL VALLE, L., and S. PIÑA-OVIEDO. 2006. HIV disorders of the brain: pathology and pathogenesis. *Front Biosci* 11: 718-732.

DEZWAAN, T., A. CARROLL, B. VALENT, and J. SWEIGARD. 1999. *Magnaporthe grisea* pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell* 11: 2013-2030.

DIXIT, A., S. CARROLL, and S. QURESHI. 2009. *Cryptococcus gattii*: An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009: 840452.

DJORDJEVIC, J., M. DEL POETA, T. SORRELL, K. TURNER, and L. WRIGHT. 2005. Secretion of cryptococcal phospholipase B1 (PLB1) is regulated by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. *Biochem J* 389: 803-812.

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

EIGENHEER, R., Y. JIN LEE, E. BLUMWALD, B. PHINNEY, and A. GELLI. 2007. Extracellular glycosylphosphatidylinositol-anchored mannoproteins and proteases of *Cryptococcus neoformans*. FEMS Yeast Res 7: 499-510.

EISENHABER, B., P. BORK, and F. EISENHABER. 1998. Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. Protein Eng 11: 1155-1161.

EISENHABER, B., P. BORK, and F. EISENHABER. 1999. Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences. J Mol Biol 292: 741-758.

EISENHABER, B., G. SCHNEIDER, M. WILDPANER, and F. EISENHABER. 2004. A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. J Mol Biol 337: 243-253.

EISENMAN, H., M. MUES, S. WEBER, S. FRASES, S. CHASKES, G. GERFEN, and A. CASADEVALL. 2007. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. Microbiology 153: 3954-3962.

ELORTZA, F., S. MOHAMMED, J. BUNKENBORG, L. FOSTER, T. NÜHSE, U. BRODBECK, S. PECK, and O. JENSEN. 2006. Modification-specific proteomics of plasma membrane proteins: identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins released upon phospholipase D treatment. J Proteome Res 5: 935-943.

FANKHAUSER, N., and P. MÄSER. 2005. Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. Bioinformatics 21: 1846-1852.

FELDMESSER, M., Y. KRESS, and A. CASADEVALL. 2001. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. Microbiology 147: 2355-2365.

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

GARCERÁ, A., A. MARTÍNEZ, L. CASTILLO, M. ELORZA, R. SENTANDREU, and E. VALENTÍN. 2003. Identification and study of a *Candida albicans* protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Ssr1p, an internal cell-wall protein. *Microbiology* 149: 2137-2145.

GÓMEZ, B., and J. NOSANCHUK. 2003. Melanin and fungi. *Curr Opin Infect Dis* 16: 91-96.

HAMADA, K., S. FUKUCHI, M. ARISAWA, M. BABA, and K. KITADA. 1998. Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 258: 53-59.

HARTLAND, R., T. FONTAINE, J. DEBEAUPUIS, C. SIMENEL, M. DELEPIERRE, and J. LATGÉ. 1996. A novel beta-(1-3)-glucanosyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* 271: 26843-26849.

HUANG, C., S. NONG, M. MANSOUR, C. SPECHT, and S. LEVITZ. 2002. Purification and characterization of a second immunoreactive mannoprotein from *Cryptococcus neoformans* that stimulates T-Cell responses. *Infect Immun* 70: 5485-5493.

HUBE, B., D. SANGLARD, F. ODDS, D. HESS, M. MONOD, W. SCHÄFER, A. BROWN, and N. GOW. 1997. Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun* 65: 3529-3538.

IDNURM, A., Y. BAHN, K. NIELSEN, X. LIN, J. FRASER, and J. HEITMAN. 2005. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol* 3: 753-764.

IKEZAWA, H. 2002. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biol Pharm Bull* 25: 409-417.

JOHNSON, K., B. JONES, A. BACIC, and C. SCHULTZ. 2003. The fasciclin-like arabinogalactan proteins of *Arabidopsis*. A multigene family of putative cell adhesion molecules. *Plant Physiol* 133: 1911-1925.

KAWAGOE, K., D. KITAMURA, M. OKABE, I. TANIUCHI, M. IKAWA, T. WATANABE, T. KINOSHITA, and J. TAKEDA. 1996. Glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient mice: implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 87: 3600-3606.

KIDD, S., F. HAGEN, R. TSCHARKE, M. HUYNH, K. BARTLETT, M. FYFE, L. MACDOUGALL, T. BOEKHOUT, K. KWON-CHUNG, and W. MEYER. 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.

KOZUBOWSKI, L., S. LEE, and J. HEITMAN. 2009. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cell Microbiol* 11: 370-380.

KROGH, A., B. LARSSON, G. VON HEIJNE, and E. SONNHAMMER. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305: 567-580.

KULKARNI, R., H. KELKAR, and R. DEAN. 2003. An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. *Trends Biochem Sci* 28: 118-121.

LAMARRE, C., N. DESLAURIERS, and Y. BOURBONNAIS. 2000. Expression cloning of the *Candida albicans* CSA1 gene encoding a mycelial surface antigen by sorting of *Saccharomyces cerevisiae* transformants with monoclonal antibody-coated magnetic beads. *Mol Microbiol* 35: 444-453.

KWON-CHUNG, K. J.; BOEKHOUT, T.; FELL, J.W., DIAZ, M. 2002. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon*, 51: 804-806,

- LATOUCHE, G., T. SORRELL, and W. MEYER. 2002. Isolation and characterisation of the phospholipase B gene of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. FEMS Yeast Res 2: 551-561.
- LEIDICH, S., D. DRAPP, and P. ORLEAN. 1994. A conditionally lethal yeast mutant blocked at the first step in glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis. J Biol Chem 269: 10193-10196.
- LEVITZ, S., and C. SPECHT. 2006. The molecular basis for the immunogenicity of *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. FEMS Yeast Res 6: 513-524.
- LIN, X. 2009. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. Infect Genet Evol 9: 401-416.
- LIN, X., and J. HEITMAN. 2006. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. Annu Rev Microbiol 60: 69-105.
- LOFTUS, B., E. FUNG, P. RONCAGLIA, D. ROWLEY, P. AMEDEO, D. BRUNO, J. VAMATHEVAN, M. MIRANDA, I. ANDERSON, J. FRASER, J. ALLEN, I. BOSDET, M. BRENT, R. CHIU, T. DOERING, M. DONLIN, C. D'SOUZA, D. FOX, V. GRINBERG, J. FU, M. FUKUSHIMA, B. HAAS, J. HUANG, G. JANBON, S. JONES, H. KOO, M. KRZYWINSKI, J. KWON-CHUNG, K. LENGELER, R. MAITI, M. MARRA, R. MARRA, C. MATHEWSON, T. MITCHELL, M. PERTEA, F. RIGGS, S. SALZBERG, J. SCHEIN, A. SHVARTSBEYN, H. SHIN, M. SHUMWAY, C. SPECHT, B. SUH, A. TENNEY, T. UTTERBACK, B. WICKES, J. WORTMAN, N. WYE, J. KRONSTAD, J. LODGE, J. HEITMAN, R. DAVIS, C. FRASER, and R. HYMAN. 2005. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. Science 307: 1321-1324.
- MCCONVILLE, M., and M. FERGUSON. 1993. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. Biochem J 294 (Pt 2): 305-324.
- MCFADDEN, D., O. ZARAGOZA, and A. CASADEVALL. 2006. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. Trends Microbiol 14: 497-505.

MOUYNA, I., W. MORELLE, M. VAI, M. MONOD, B. LÉCHENNE, T. FONTAINE, A. BEAUVAIS, J. SARFATI, M. PRÉVOST, C. HENRY, and J. LATGÉ. 2005. Deletion of GEL2 encoding for a beta(1-3)glucanosyltransferase affects morphogenesis and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol* 56: 1675-1688.

MUKHERJEE, P., K. SESHAN, S. LEIDICH, J. CHANDRA, G. COLE, and M. GHANNOUM. 2001. Reintroduction of the PLB1 gene into *Candida albicans* restores virulence in vivo. *Microbiology* 147: 2585-2597.

NAKAI, K., and P. HORTON. 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* 24: 34-36.

NIELSEN, H., J. ENGELBRECHT, S. BRUNAK, and G. VON HEIJNE. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10: 1-6.

NOSJEAN, O., A. BRIOLAY, and B. ROUX. 1997. Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. *Biochim Biophys Acta* 1331: 153-186.

ORLEAN, P., and A. MENON. 2007. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycopospholipids. *J Lipid Res* 48: 993-1011.

PARK, B.J., *et al.*, 2008. Refocusing on a re-emergent disease: the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. In: The 48th Annual ICAAC/IDSA 46th Annual Meeting. ASM, Washington, DC.

PAULICK, M., and C. BERTOZZI. 2008. The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry* 47: 6991-7000.

PERFECT, J. 2006. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. *FEMS Yeast Res* 6: 463-468.

PIERLEONI, A., P. MARTELLI, and R. CASADIO. 2008. PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics* 9: 392.

- PITTET, M., and A. CONZELMANN. 2007. Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1771: 405-420.
- POISSON, G., C. CHAUVE, X. CHEN, and A. BERGERON. 2007. FragAnchor: a large-scale predictor of glycosylphosphatidylinositol anchors in eukaryote protein sequences by qualitative scoring. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 5: 121-130.
- POPOLO, L., M. VAI, E. GATTI, S. PORELLO, P. BONFANTE, R. BALESTRINI, and L. ALBERGHINA. 1993. Physiological analysis of mutants indicates involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored protein gp115 in morphogenesis and cell separation. *J Bacteriol* 175: 1879-1885.
- PUKKILA-WORLEY, R., Q. GERRALD, P. KRAUS, M. BOILY, M. DAVIS, S. GILES, G. COX, J. HEITMAN, and J. ALSPAUGH. 2005. Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. *Eukaryot Cell* 4: 190-201.
- PUKKILA-WORLEY, R., and E. MYLONAKIS. 2008. Epidemiology and management of cryptococcal meningitis: developments and challenges. *Expert Opin Pharmacother* 9: 551-560.
- RAGNI, E., A. COLUCCIO, E. ROLLI, J. RODRIGUEZ-PEÑA, G. COLASANTE, J. ARROYO, A. NEIMAN, and L. POPOLO. 2007. GAS2 and GAS4, a pair of developmentally regulated genes required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 6: 302-316.
- REESE, A., A. YONEDA, J. BREGER, A. BEAUVAIS, H. LIU, C. GRIFFITH, I. BOSE, M. KIM, C. SKAU, S. YANG, J. SEFKO, M. OSUMI, J. LATGE, E. MYLONAKIS, and T. DOERING. 2007. Loss of cell wall alpha(1-3) glucan affects *Cryptococcus neoformans* from ultrastructure to virulence. *Mol Microbiol* 63: 1385-1398.
- RICHARD, M., and A. PLAINE. 2007. Comprehensive analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 6: 119-133.

RODRIGUES, M., L. NIMRICHTER, D. OLIVEIRA, S. FRASES, K. MIRANDA, O. ZARAGOZA, M. ALVAREZ, A. NAKOUZI, M. FELDMESSER, and A. CASADEVALL. 2007. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot Cell* 6: 48-59.

ROSA E SILVA, L., C. STAATS, L. GOULART, L. MORELLO, M. PELEGRINELLI FUNGARO, A. SCHRANK, and M. VAINSTEIN. 2008. Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. *Res Microbiol* 159: 221-229.

SALAS, S., J. BENNETT, K. KWON-CHUNG, J. PERFECT, and P. WILLIAMSON. 1996. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med* 184: 377-386.

SANGLARD, D., B. HUBE, M. MONOD, F. ODDS, and N. GOW. 1997. A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect Immun* 65: 3539-3546.

SIAFAKAS, A., T. SORRELL, L. WRIGHT, C. WILSON, M. LARSEN, R. BOADLE, P. WILLIAMSON, and J. DJORDJEVIC. 2007. Cell wall-linked cryptococcal phospholipase B1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell wall integrity. *J Biol Chem* 282: 37508-37514.

SONG, S., J. SHIN, J. DE GUZMAN, J. KIM, H. YU, B. JHA, H. KONG, Y. HONG, and D. CHUNG. 2010. *Paragonimus westermani*: identification and characterization of the fasciclin I domain-containing protein. *Exp Parasitol* 125: 76-83.

SORRELL, T. 2001. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol* 39: 155-168.

SORRELL, T., S. CHEN, P. RUMA, W. MEYER, T. PFEIFFER, D. ELLIS, and A. BROWNLEE. 1996. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. *J Clin Microbiol* 34: 1253-1260.

WEIG, M., L. JÄNSCH, U. GROSS, C. DE KOSTER, F. KLIS, and P. DE GROOT. 2004. Systematic identification in silico of covalently bound cell wall proteins and analysis of protein-polysaccharide linkages of the human pathogen *Candida glabrata*. *Microbiology* 150: 3129-3144.

YIN, Q., P. DE GROOT, H. DEKKER, L. DE JONG, F. KLIS, and C. DE KOSTER. 2005. Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *J Biol Chem* 280: 20894-20901.

YONEDA, A., and T. DOERING. 2006. A eukaryotic capsular polysaccharide is synthesized intracellularly and secreted via exocytosis. *Mol Biol Cell* 17: 5131-5140.

ZARAGOZA, O., M. RODRIGUES, M. DE JESUS, S. FRASES, E. DADACHOVA, and A. CASADEVALL. 2009. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol* 68: 133-216.

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

8. ANEXO

8.1 CURRICULUM VITAE RESUMIDO

OLIVEIRA, E.S.

DADOS PESSOAIS:

Nome: *Eder Silva de Oliveira*

Data de nascimento: *23/10/1983*

Local: *Porto Alegre, Rio Grande do Sul/Brasil*

Endereço Profissional: *Centro de Biotecnologia.*

*Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Campus do Vale - Prédio 43421
Av. Bento Gonçalves 9500 - Cx. Postal 15005 - CEP 91501-970 - Porto Alegre,
RS*

Telefone Profissional: *(051) 33087767*

email: *eder.oliveira@ufrgs.br*

FORMAÇÃO:

.2004-2008

Bacharelado em Ciências Biológicas. Ênfase funcional, celular e molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

.2009 – até o presente

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Programa de Pós-graduação em Biologia celular e molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ESTÁGIOS:

.2005

Bolsista de Iniciação Científica.

Orientador(es): Professora Dra. Marilene Henning Vainstein e Professor Dr. Augusto Schrank

Projeto: Epidemiologia de *Cryptococcus neoformans*: aspectos moleculares

Fonte de financiamento: PIBIC/CNPq; BIC/UFRGS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Centro de Biotecnologia/UFRGS.
Laboratório de fungos de importância médica e biotecnológica.

.2006-2007

Bolsista de Iniciação Científica.
Orientadora: Professora Dra. Marilene Henning Vainstein.
Projeto: Produção de biodiesel através da transesterificação de óleo vegetal e álcool utilizando-se lipase imobilizada
Fonte de Financiamento: BIC/UFRGS
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Centro de Biotecnologia/UFRGS.
Laboratório de fungos de importância médica e biotecnológica.

.2008

Bolsista de Iniciação Científica.
Orientadora: Professora Dra. Marilene Henning Vainstein.
Projeto: Biologia molecular do fungo patogênico *Cryptococcus neoformans*.
Fonte de Financiamento: BIC/UFRGS
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Centro de Biotecnologia/UFRGS.
Laboratório de fungos de importância médica e biotecnológica.

PRÊMIOS E DISTINÇÕES:

. Destaque no XIX Salão de Iniciação científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Sessão Microbiologia.

OLIVEIRA, E.S.; BUSSAMARA, R.; VAINSTEIN, M.H. Purificação de uma lipase extracelular da levedura *Pseudozyma hubeiensis* para sua utilização como catalisador na produção de biodiesel. Outubro, 2007.

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS:

BUSSAMARA, R., FUENTEFRIA, A., OLIVEIRA, E.S, BROETTO, L., SIMCIKOVA, M., VALENTE, P., SCHRANK, A., VAINSTEIN. M.H. 2010. *Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. Bioresour Technol* 101: 268-275.

RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS:

OLIVEIRA, E.S., BUSSAMARA, R., VAINSTEIN, M.H., *Produção e purificação de uma lipase da levedura Pseudozyma hubeiensis para sua utilização como catalisador na produção de biodiesel. XVII salão de Iniciação científica UFRGS. Sessão bioquímica. Outubro, 2005.*

BUSSAMARA, R. R., FUENTEFRIA, A., OLIVEIRA, E.S., VALENTE, P., VAINSTEIN., M.H. *Produção e imobilização da lipase de Pseudozyma hubeiensis para utilização em aplicações biotecnológicas. VII Seminário Brasileiro de Tecnologia enzimática. Maio, 2006.*

OLIVEIRA, E.S., BUSSAMARA, R., VAINSTEIN, M.H. *Purificação de uma lipase extracelular da levedura Pseudozyma hubeiensis para sua utilização como catalisador na produção de biodiesel. XVIII Salão de Iniciação científica. Sessão Microbiologia. Outubro, 2006.*

OLIVEIRA, E.S.; BUSSAMARA, R.; VAINSTEIN, M.H. *Purificação de uma lipase extracelular da levedura Pseudozyma hubeiensis para sua utilização como catalisador na produção de biodiesel. Sessão Microbiologia. Outubro, 2007.*

OLIVEIRA, E.S., STAATS, C.C., VAINSTEIN, M.H., SCHRANK, A. Homeostase do ferro: Busca por proteínas ortólogas em *Cryptococcus neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis*. 26ª REGEM-Reunião de genética de microrganismos. Setembro, 2008.

CRESTANI, J., OLIVEIRA., E.S., ROSA E SILVA, L.K., STAATS, C.C., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. Proteomics of iron deprivation in *Cryptococcus gattii*. 54º Congresso brasileiro de genética. Setembro, 2008.

CRESTANI, J., OLIVEIRA., E.S., ROSA E SILVA, L.K., STAATS, C.C., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. Proteomics of iron deprivation in *Cryptococcus gattii*. 26º REGEM-Reunião de genética de microrganismos. setembro, 2008.

OLIVEIRA, E.S., CRESTANI, J., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. Identificação de proteínas diferencialmente expressas em *Cryptococcus gattii* sob limitação de ferro. XX Salão de Iniciação Científica UFRGS. Sessão Genética Molecular B. outubro, 2008.

OLIVEIRA, E.S., STAATS, C.C., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. Identificação *in silico* de proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol nas espécies do Complexo *Cryptococcus neoformans*. 27º REGEM-Reunião de genética de microrganismos. Setembro, 2010.