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

# Estudo de novos componentes da via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina em *Cryptococcus neoformans*

Dissertação de Mestrado

**Andrea Gomes Tavanti**

**Porto Alegre, fevereiro de 2021**

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

# Estudo de novos componentes da via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina em *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.

**Andrea Gomes Tavanti**

Orientadora: Profa. Dra. Lívia Kmetzsch Rosa e Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

**Porto Alegre, fevereiro de 2021**

**Este trabalho foi desenvolvido na Unidade de Biologia Teórica e Computacional e no Laboratório de Biologia Molecular de Patógenos, ambos situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.**

## Agradecimentos

Não está em uma ordem específica porque todas as pessoas que quero agradecer contribuíram de formas diferentes e não menos importantes.

Começo com a minha família, que em todos os dias da minha vida me deu todas as condições necessárias para ter uma educação de qualidade. Obrigada a minha mãe e meu pai, Niara e Ricardo, pelo amor, carinho e compreensão, por sempre me escutarem e me aconselharem nas horas mais difíceis, por serem fontes inesgotáveis de sabedoria. Obrigada aos meus irmãos Umberto, Márcio e Marcelo por compartilharem suas vivências e por serem amigos incondicionais. Obrigada aos meus tios Maristela, Nestor e Renato que são acima de tudo grandes amigos que acalmam o meu coração sempre que eu preciso. Obrigada ao meu marido Lucas, que sempre forneceu apoio, conselhos, otimismo, amor e carinho. Nas piores horas, tua energia me impulsionou para caminhos melhores. As minhas outras famílias, Fialho e Zawacki que são mais uma fonte de amor e apoio familiar na minha vida. A minha amiga Tuti, que me escuta, que me aconselha estando disposta a ajudar sempre, sendo uma irmã de coração!

Obrigada a minha orientadora Prof ª Dra. Lívia Kmetzsch que me acolheu como orientada em um momento pessoal extremamente desafiador. Por tirar cada uma das minhas dúvidas, ser aberta ao diálogo, compreensiva e um grande exemplo do tipo de profissional que quero me tornar.

Obrigada ao meu co-orientador Prof. Dr. Charley Staats por me apoiar e guiar dentro das etapas do projeto e ainda por ser muito compreensivo com as minhas dificuldades.

Aos meus colegas bioinformatas da UBTEC que deram apoio incondicional, transmitindo seus conhecimentos adquiridos e somando para um ambiente de trabalho divertido e enriquecedor.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Patógenos por também passarem os seus conhecimentos, tirarem as minhas dúvidas e me auxiliarem nos experimentos de bancada sempre com muito bom humor!

A todos os colegas e professores do Centro de Biotecnologia que colaboraram com suas perspectivas e conhecimentos na minha formação.

**Sumário**

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades.....V
Resumo.....VI
Abstract.....VII
1. Introdução.....1
1.1 Criptococose: uma doença fúngica aguda e invasiva.....1
1.2 O agente etiológico causador da criptococose em indivíduos imunocomprometidos.....2
1.3 Mecanismos de disseminação e invasão de *C. neoformans*.....3
1.3.1 Escape e disseminação do ambiente pulmonar.....3
1.3.2 Invasão do parênquima cerebral.....5
1.4 Determinantes de virulência.....6
1.4.1 Desenvolvimento em temperatura fisiológica de 37ºC.....6
1.4.2 Cápsula polissacarídica.....7
1.4.3 Melanina.....8
1.4.4 Urease.....8
1.4.5 Fosfolipase B.....9
1.5 Via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina.....10
1.6 Atuais tratamentos para criptococose e suas limitações.....14
1.7 Biologia de sistemas e a exploração de alvos.....15
2. Objetivos.....17
2.1 Objetivo geral.....17
2.2 Objetivos específicos.....17
3. Resultados.....18
4. Discussão.....44
5. Conclusões.....47
6. Perspectivas.....48
7. Referências.....49

**Lista de abreviaturas, símbolos e unidades**

ºC: graus Celsius
AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida
BHE: Barreira hematoencefálica
CDRE: elemento de resposta dependente da calcineurina
DNA: ácido desoxirribonucléico
GalXM: galactoxilomanana
GXM: glucoronoxilomanana
HBMEC: células endoteliais microvasculares cerebrais humanas
HIV: vírus da imunodeficiência humana
MC: meningoencefalite criptocócica
mRNA: RNA mensageiro
NFAT: fator nuclear de células T ativadas
NTD: doenças tropicais negligenciadas
PCR: reação em cadeia da DNA polimerase
RNA: ácido ribonucléico
RNA-seq: sequenciamento de RNA
SNC: sistema nervoso central
WHO: Organização Mundial da Saúde

**Resumo**

*Cryptococcus neoformans* é uma levedura basidiomicética, principal agente etiológico da criptococose em humanos. A forma mais grave desta doença, denominada meningoencefalite criptocócica, tem incidência global de 220.000 casos e causa aproximadamente 181.000 mortes anualmente. A via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina tem papel essencial na adaptação criptocócica às condições encontradas no hospedeiro durante o desenvolvimento da doença. O objetivo deste trabalho foi explorar esta via de sinalização em busca de novos possíveis componentes que impactam a virulência de *C. neoformans*. Inicialmente, realizamos uma análise *in silico* de dados brutos transcritômicos de RNA-seq relacionados a três mutantes nulos para produtos gênicos chave desta via: fosfatase calcineurina, fator de transcrição Crz1, e transportador de cálcio Pmc1. Após uma análise integrada de redes de interação entre os genes diferencialmente expressos por biologia de sistemas, selecionamos CNAG_00522 como um novo potencial membro da via cálcio-calcineurina. Este gene é comum às redes geradas para os mutantes *pmc1*Δ e *cna1*Δ, e é regulado positivamente por esses componentes. Buscas por domínios conservados revelaram a presença de um domínio relacionado a *C2B_Tricalbin*, o qual tem conexão a módulos de direcionamento de membrana dependentes de $Ca^{2+}$ que ligam diferentes moléculas, como fosfolipídios, polifosfatos de inositol e proteínas intracelulares. No intuito de aprofundar a caracterização funcional de CNAG_00522, avaliamos os níveis de transcritos deste gene por RT-qPCR em amostras de cDNA de *C. neoformans* obtidas de linhagens selvagem (WT) e mutantes (*pmc1*Δ e *crz1*Δ) cultivadas em diferentes condições de temperatura e presença e ausência de cálcio. Observamos que a expressão de CNAG_00522 é regulada positivamente a 37ºC, e o fator de transcrição Crz1 é um potencial regulador negativo da expressão deste gene. Análises funcionais baseadas na deleção de CNAG_00522 devem ser conduzidas no intuito de confirmar a participação deste gene na via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina, assim como avaliar o papel deste componente na virulência de *C. neoformans*.

**Abstract**

*Cryptococcus neoformans* is a basidiomycetous yeast and the main etiological agent of cryptococcosis in humans. The most severe form of this disease, called cryptococcal meningoencephalitis, has a global incidence of 220,000 cases and causes approximately 181,000 deaths annually. The calcium and calcineurin-mediated signaling pathway plays an essential role in cryptococcal adaptation to host conditions during disease development. The aim of this work was to explore this signaling pathway to search for new possible components that impact the virulence of *C. neoformans*. Initially, we performed an *in silico* analysis of RNA-seq transcriptomic data related to three null mutants for key gene products of this pathway: calcineurin phosphatase, Crz1 transcription factor, and Pmc1 calcium transporter. After an integrated analysis of interaction networks between genes differentially expressed using systems biology, we selected CNAG_00522 as a new potential member of the calcium-calcineurin pathway. This gene is common to the networks generated for the *pmc1*Δ and *cna1*Δ mutants, and it is positively regulated by these components. Analysis of conserved domains in the primary sequence of this protein revealed the presence of a C2B_Tricalbin related domain, which is associated with $Ca^{2+}$ dependent membrane targeting modules that bind to different molecules, such as phospholipids, inositol polyphosphates and intracellular proteins. In order to further characterize the CNAG_00522 gene, we evaluated its transcript levels by RT-qPCR in *C. neoformans* cDNA samples obtained from wild (WT) and mutant strains (*pmc1*Δ and *crz1*Δ) grown under different conditions of temperature and in the presence and absence of calcium. We observed that CNAG_00522 expression is positively regulated at 37ºC, and that the transcription factor Crz1 is a potential negative regulator of the expression of this gene. Functional analysis based on the CNAG_00522 deletion should be conducted in order to confirm the participation of this gene in the signaling pathway mediated by calcium and calcineurin, as well as to evaluate the role of this component in the virulence of *C. neoformans*.

# 1. Introdução

## 1.1 Criptococose: uma doença fúngica aguda e invasiva

Doenças graves de etiologia fúngica tem um profundo impacto na saúde humana com estimativas de mais de 150 milhões de indivíduos afetados (Bongomin et al., 2017). Além das consequências causadas na rotina de indivíduos acometidos, muitas dessas enfermidades podem levar a óbito, com estimativa de mortalidade mundial de 1,6 milhões anuais (Bongomin et al., 2017).

Entre as doenças fúngicas classificadas como agudas e invasivas destaca-se a criptococose (Bongomin et al., 2017). Esta doença possuí diversas manifestações clínicas, podendo afetar diferentes órgãos e, em sua forma mais grave, causar infecção no Sistema Nervoso Central (SNC) culminando em um quadro de meningoencefalite criptocócica (MC) (Zavala & Baddley, 2020). Indivíduos imunocomprometidos são os principais afetados pela MC, com uma maior frequência em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Zavala & Baddley, 2020).

A MC é responsável por mais de 220.000 casos e aproximadamente 181.000 mortes anuais (Rajasingham et al., 2017). Os países com maior prevalência da doença são os que se encontram na África Subsaariana e Sudeste Asiático, como também a Índia. Contudo, países da África Subsaariana são os mais afetados, com 72% do número de casos e 75% do número de mortes do total para a doença. A MC é responsável mundialmente por aproximadamente 15% das mortes relacionadas à AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida) (Rajasingham et al., 2017). No Brasil, um estudo epidemiológico relacionado à MC, o qual abrange o período de 2000 a 2012, constatou que 75% das 5.755 mortes no período pela doença eram relacionadas com a AIDS (Soares et al., 2019).

Recentemente foi proposta a inclusão da MC na lista de doenças tropicais negligenciadas (NTD) (Molloy et al., 2017). A doença se enquadra nos critérios de

definição de NTDs definidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO): afeta principalmente populações pobres causando significativa morbidade e mortalidade; afeta principalmente populações vivendo em regiões tropicais e subtropicais; é passível de amplo controle, eliminação ou erradicação; e tem pouco investimento em pesquisa. Rodrigues & Albuquerque (2018) reforçam que, de acordo com o mais recente relatório da *Global Funding of Innovation for Neglected Diseases* (G-Finder), é evidente a falta de investimento em pesquisa relacionada à MC.

### 1.2 O agente etiológico da criptococose em indivíduos imunocomprometidos

O gênero *Cryptococcus* compreende espécies dentro do filo Basidiomycota as quais são isoladas em diferentes nichos ambientais, sendo consideradas agentes etiológicos da criptococose em humanos (May et al., 2016). Recentemente, Kwon-Chung et al. (2017) propuseram a classificação das espécies patogênicas desse gênero em dois grandes complexos: o complexo de espécies *Cryptococcus neoformans* e o complexo de espécies *Cryptococcus gattii. C. neoformans* é o principal agente etiológico da criptococose em indivíduos imunocomprometidos, acometendo principalmente indivíduos portadores de HIV que desenvolvem a AIDS (May et al., 2016).

A infecção humana ocorre pela inalação de basidiósporos ou da levedura dessecada presentes principalmente em excretas de pombos (May et al., 2016). Existem alguns possíveis cenários de interação patógeno-hospedeiro após a infecção. Em indivíduos imunocompetentes, a levedura é eliminada pelo sistema imunitário ou estabelece uma infecção latente assintomática. Em indivíduos imunocomprometidos, células fúngicas causam uma pneumonia sintomática, podendo transmigrar para outros locais. Por disseminação via corrente sanguínea, atinge principalmente o SNC pela transmigração da barreira hematoencefálica (BHE), o que desencadeia um quadro de MC (Figura 1) (Lin & Heitman, 2006, Mitchell et al. 2011).

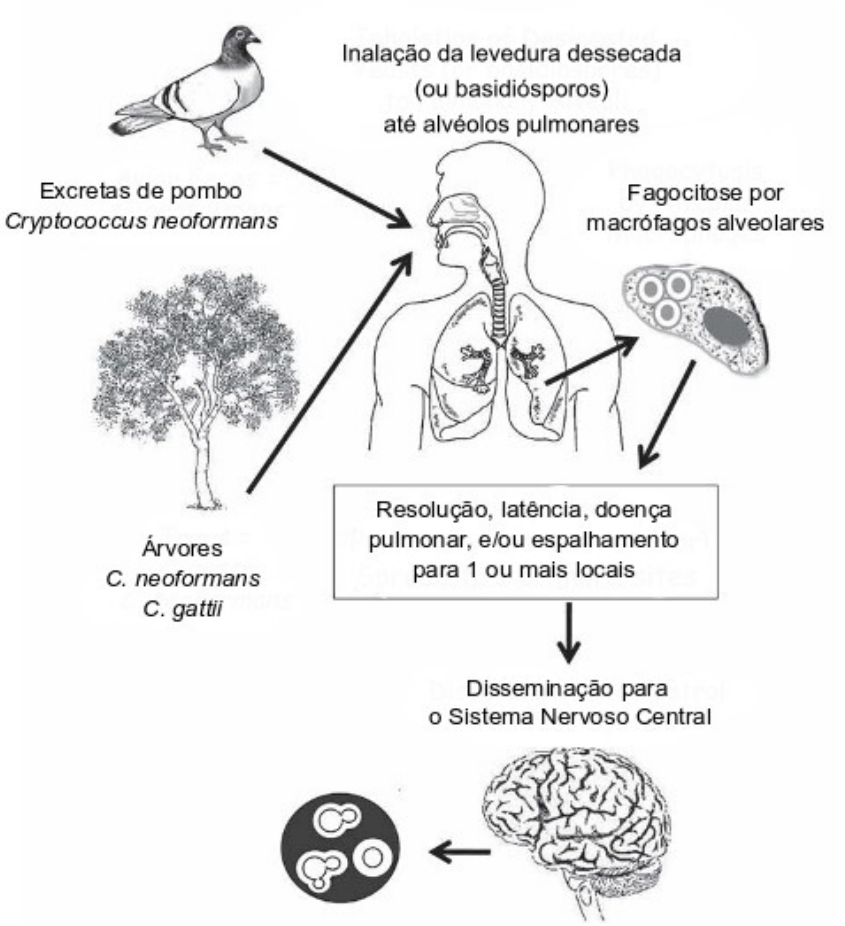



**Figura 1: Nichos ambientais de *Cryptococcus* e estabelecimento da infecção.** Células de levedura dessecada ou basidiósporos presentes nos nichos indicados são inalados pelo hospedeiro humano. No ambiente pulmonar, células fúngicas são expostas à resposta imunológica inata do hospedeiro, a qual pode eliminar a infecção, controlar a infecção (mantendo a latência) ou permitir a transmigração. Um dos principais sítios de disseminação da levedura é o SNC, onde ocorrerá o estabelecimento da MC. Figura adaptada de Mitchell et al. 2011.

### 1.3 Mecanismos de disseminação e invasão de *C. neoformans*

#### 1.3.1 Escape e disseminação do ambiente pulmonar

Para *C. neoformans* disseminar e invadir com sucesso o SNC, a levedura deve ser capaz de manter um número mínimo de células viáveis no ambiente pulmonar, escapar da resposta imunológica do hospedeiro, atingir a corrente sanguínea para transmigrar pela BHE, levando à invasão efetiva do parênquima cerebral (Griffiths et al., 2012; May et al., 2016; Denham & Brown, 2018). Células de *C. neoformans* mantêm sua viabilidade no ambiente hospedeiro pela expressão

de determinantes de virulência (May, et al. 2016). Adicionalmente, a levedura forma células gigantes denominadas *Titan cells* que têm um diâmetro total celular acima de 30µm, sendo o tamanho de uma célula típica de *C. neoformans* de 5-7µm (Zaragoza & Nielsen, 2013) . Essas células representam um morfotipo de resistência que, por serem gigantes, conseguem escapar da ação fagocitária da resposta imunitária inata e que também contribuem para a manutenção do reservatório de células viáveis através da replicação. (Zaragoza & Nielsen, 2013; Denham & Brown, 2018).

*C. neoformans* consegue disseminar do ambiente pulmonar para outros sítios por mecanismos de entrada na corrente sanguínea: no interior de macrófagos, e por cruzamento paracelular ou transcitose de células epiteliais pulmonares (Figura 2) (Denham & Brown, 2018).

O mecanismo de saída das células criptocócicas dos macrófagos mais bem descrito atualmente é o de forma não lítica, denominado vomocitose, processo de extrema importância para o estabelecimento de uma MC no SNC (Denham & Brown, 2018). A levedura pode ainda escapar da ação antifúngica do macrófago de forma lítica, levando a inviabilidade da célula de defesa. Ainda, as células de *C. neoformans* podem se transferir lateralmente entre macrófagos (García-Rodas & Zaragoza, 2012; Johnston & May, 2013; Denham & Brown, 2018).

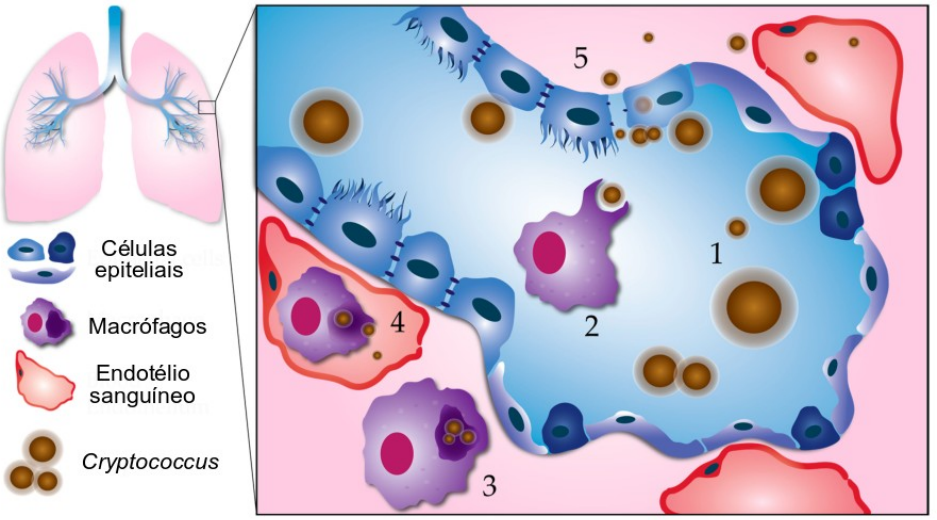


**Figura 2: Sobrevivência e mecanismos de disseminação de *Cryptococcus spp.* do ambiente pulmonar.** 1 – Formação de células gigantes para manutenção do reservatório de células viáveis. 2 – Fagocitose de células fúngicas menores. 3 – Sobrevivência das células dentro de fagolisossoma de macrófagos pela expressão de determinantes de virulência. 4 – Células de *C. neoformans* viáveis sendo liberadas por macrófagos, em um mecanismo denominado vomocitose. 5 – Escape das células criptocócicas do ambiente pulmonar pelos mecanismos de travessia paracelular ou transcitose. Adaptado de Denham & Brown (2018).

### 1.3.2 Invasão do parênquima cerebral

Existem três mecanismos descritos de passagem das células de *C. neoformans* pela BHE para a invasão do parênquima cerebral: por cavalo de troia, por transcitose e por paracitose (Liu et al., 2012; May et al., 2016; Taylor-Smith & May, 2016; Denham & Brown, 2018). O artifício do cavalo de troia se refere a leveduras que foram fagocitadas no ambiente pulmonar, as quais são transportadas até a BHE por células de macrófagos. Estas células imunes transpassam a BHE, e as células fúngicas escapam do macrófago para o parênquima cerebral através de vomocitose. A transcitose se refere as células fúngicas que transpassam a BHE por endocitose de células endoteliais cerebrais. A paracitose se refere ao enfraquecimento das junções de células endoteliais para que células de levedura transpassem pela BHE entre as conexões célula-célula. Acredita-se que esses mecanismos ocorram simultaneamente para a levedura estabelecer uma infecção no parênquima cerebral, porém o mecanismo cavalo de troia parece ser essencial para o estabelecimento da MC, uma vez que a depleção de macrófagos em modelo murino reduziu significativamente a infecção do SNC (Figura 3) (Kechichian et al., 2007; May et al., 2016)

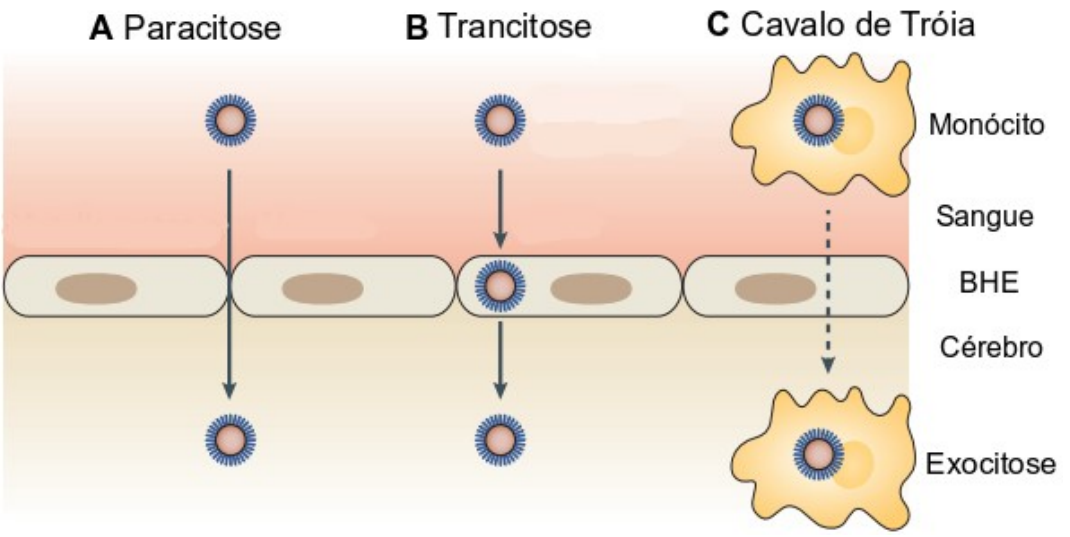



**Figura 3: Mecanismos de invasão do SNC.** A – Paracitose, enfraquecimento das junções de células endoteliais permitindo que as células fúngicas invadam o CNS. B – Trancitose, invasão das células endoteliais e passagem para parênquima cerebral. C - Cavalo de troia, passagem de macrófagos contendo células de levedura pela BHE para o cérebro. Figura adaptada de May et al. (2016).

### 1.4 Determinantes de virulência

*C. neoformans* necessita sobrepor mecanismos de defesa e limitações impostas pelo hospedeiro mamífero ao longo do estabelecimento da infecção. Desafios como as limitações nutricionais, um ambiente com pH ácido e radicais livres são enfrentados principalmente com o auxílio da produção de determinantes de virulência (Zaragoza, 2019). A expressão destes determinantes é regulada por diferentes rotas de sinalização, as quais são ativadas para a adaptação da levedura ao ambiente hospedeiro (Kozubowski et al., 2009; Zaragoza, 2019). Nessa seção terão destaque alguns dos mais importantes determinantes de virulência de *C. neoformans*.

#### 1.4.1 Desenvolvimento em temperatura fisiológica de 37ºC

A capacidade de sobrevivência na temperatura fisiológica humana é uma característica fundamental para a patogenicidade de *C. neoformans* (Buchanan & Murphy, 1998). Mutantes nulos para calcineurina, uma fosfatase fundamental para o processo de termotolerância, são incapazes de causar infecção em modelo murino (Odom et al., 1997; Fox et al., 2001). Genes que sofrem alteração de

expressão mediante exposição à temperatura do hospedeiro vêm sendo investigados. Um estudo de expressão diferencial através de microarranjos demonstrou que 49 genes têm a sua expressão induzida pela temperatura do hospedeiro. Entre eles, está o fator de transcrição Mga2, que possui como alguns de seus potenciais alvos, genes codificantes de enzimas biossintéticas de ácidos graxos, indicando que a remodelação de membrana é importante para o desenvolvimento em altas temperaturas (Kraus et al., 2004). Outro estudo usando análise da diferença representacional identificou 29 genes induzidos em temperatura de 37ºC. Esses genes estão relacionados a integridade de parede celular, resposta ao estresse, filamentação, metabolismo oxidativo, metabolismo de ácidos graxos e transporte de proteínas (Rosa e Silva et al., 2008). Recentemente, a análise de um ensaio de gradiente de temperatura identificou 46 genes envolvidos em desenvolvimento em altas temperaturas (Stempinski et al., 2020). Os autores realizaram adicionalmente um estudo utilizando o banco de dados STRING, o qual evidenciou a potencial interação entre produtos gênicos relacionados à via de sinalização mediada por cálcio-calcineurina, vias secretórias, processamento de RNA, e divisão celular.

### 1.4.2 Cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica envolve o corpo celular de *C. neoformans,* sendo de fundamental importância para a virulência deste patógeno. Esta estrutura é composta principalmente pelos polissacarídeos glicuroxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), e também em menor proporção por manoproteínas, ácido hialurônico e ácido siálico (Zaragoza et al., 2009; Kwon-chung et al., 2014). A cápsula é altamente hidrofílica e fica ancorada à parede celular, sendo organizada em fibras ramificadas. Ainda, essa estrutura de proteção é complexa e dinâmica, podendo mudar de tamanho de acordo com estímulos do ambiente (Zaragoza et al., 2009; Zaragoza, 2019).

Os principais papéis desempenhados pela cápsula são: maior resistência a fagocitose, maior resistência a estresse oxidativo e desidratação, e modulação da resposta imunológica (Zaragoza, 2019). A estrutura capsular age como barreira

física para a levedura, através da ocultação de epítopos específicos da parede celular que permitem o reconhecimento do patógeno por macrófagos e, como consequência, o engolfamento de células de *C. neoformans* com cápsulas mais robustas é menor (Kozel & Mastroianni, 1976; Kozel & Gotschlich, 1982; García-Rodas & Zaragoza, 2012). Pela sua natureza hidrofílica, a cápsula também confere proteção ao dessecamento (Aksenov et al. 1973). Além disso, a cápsula está relacionada à resistência a alguns antifúngicos, como anfotericina B, e também confere um efeito protetor aos mecanismos microbicidas presentes em células macrofágicas, conferindo resistência ao estresse oxidativo e a peptídeos antimicrobianos (Zaragoza et al., 2008). Por fim, a estrutura capsular tem ainda um papel muito importante na regulação da resposta imunitária do hospedeiro, pela inibição de migração de leucócitos, diminuição da expressão de receptores de quimiocinas, inibição da produção de anticorpos, alteração da produção de citocinas e indução de apoptose celular em leucócitos (revisado por Zaragoza, 2019).

### 1.4.3 Melanina

A melanina é um pigmento escuro produzido por células de *C. neoformans* pela ação da atividade de difenol oxidase da enzima lacase, a qual oxida substratos fenólicos em quinonas (Nurudeen & Ahearn, 1979; Pukkila-Worley et al., 2005). A enzima lacase (Lac1) é codificada principalmente pelo gene *LAC1* (Pukkila-Worley et al., 2005). Em *C. neoformans,* a melanina produzida é depositada na parede celular, e possui uma miríade de funções ligadas a sobrevivência e adaptação desse patógeno. Um exemplo está na maior resistência de *C. neoformans* em condições de baixas e altas temperaturas (Rosas & Casadevall, 1997). Além disto, recentemente foi demonstrado que o pigmento auxilia na captura de calor, caso a levedura esteja exposta a baixas temperaturas (Cordero et al., 2018). A melanina também tem um efeito protetivo com relação à radiação ultravioleta (Wang & Casadevall, 1994). Esse pigmento foi associado à modulação da resposta inflamatória do hospedeiro e proteção contra estresse oxidativo dentro de macrófagos (Liu et al., 1999; Mednick et al., 2005).

Além disso, a melanina produzida por *C. neoformans* confere resistência aos fármacos antifúngicos anfotericina B e caspofungina (van Duin et al., 2002; Ikeda et al., 2003). Linhagens com deficiência na produção desse pigmento mostraram significativa atenuação de virulência em modelo murino (Kwon-Chung et al., 1982). Por fim, esse efeito também foi observado em linhagens mutantes para o gene *LAC1,* evidenciando a importância da melanina na sobrevivência e adaptação ao ambiente hospedeiro (Salas et al., 1996).

### 1.4.4 Urease

Urease é uma metaloenzima que hidrolisa ureia em amônia e carbamato, sendo codificada pelo gene *URE1* em *C. neoformans* (Cox et al., 2000). A produção dessa enzima em altas concentrações é uma característica marcante de *C. neoformans,* fazendo com que sua detecção seja utilizada como ferramenta para o diagnóstico de doença (Zimmer & Roberts, 1979; Canteros et al., 1996). Foi extensamente demonstrado que essa enzima é um importante determinante de virulência de *C. neoformans,* apresentando influência significativa na disseminação da levedura do ambiente pulmonar para o cérebro (Cox et al., 2000; Olszewski et al., 2004; Shi et al., 2010; Fu et al., 2018). Finalmente, a urease também influencia no aumento do pH de fagolisossomos, o que está correlacionado com a proteção contra a resposta imunológica humoral, a persistência da infecção e a disseminação da levedura para o SNC (Fu et al., 2018).

### 1.4.5 Fosfolipase B

Fosfolipases são um grupo diversificado de enzimas que hidrolisam ligações ésteres de glicerofosfolipídeos que compõe membranas celulares e surfactante pulmonar. As suas funções estão ligadas a desestabilização e degradação de membranas, sinalização celular e influência na resposta imunitária do hospedeiro, e por esses motivos são enzimas extremamente importantes para a sobrevivência de diferentes fungos (Djordjevic, 2010). Plb1 é uma fosfolipase multifuncional de *C. neoformans,* apresentando atividades de fosfolipase B,

lisofosfolipase e lisofosfolipase transacilase (Chen et al., 1997; Cox et al., 2001). Para o ambiente pulmonar, a atividade dessa enzima foi correlacionada com uma maior adesão das células criptocócicas a células do epitélio pulmonar hospedeiro (Ganendren et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que mutantes nulos *plb1* tem defeitos de proliferação dentro de células de macrófagos e produzem um número maior de células gigantes durante a infecção (Evans et al., 2015). Estes mutantes são hipovirulentos em modelo murino, e falham em disseminar para o SNC. Ainda, no mesmo estudo, foi constatado que a proteína Sec14 é essencial para a secreção de Plb1, sendo Plb1 crucial para o processo de vomocitose (Chayakulkeeree et al., 2011). Finalmente, foi evidenciado que Plb1 ativa a proteína hospedeira Rac1 e estimula a sua associação com o fator de transcrição STAT3, o que por sua vez culmina em uma reorganização do citoesqueleto de células endoteliais microvasculares cerebrais humanas (HBMEC). Esse rearranjo de citoesqueleto facilita a passagem pela BHE, sendo essencial para colonização do parênquima cerebral (Maruvada et al., 2012).

### 1.5 Via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina

A via mediada por cálcio e calcineurina está entre as principais vias de sinalização que são essenciais para a virulência e sobrevivência de *C. neoformans* (Kozubowski et al., 2009). Esta via de sinalização é ativada por íons de cálcio, um importante mensageiro que medeia respostas a diversos estímulos ambientais (Roy et al., 2020). Essa cascata de sinalização apresenta diversos componentes, e é ativada por estresses ambientais que ocasionam um aumento de cálcio intracelular (Liu et al., 2015).

A concentração de íons de cálcio no citosol das células fúngicas pode variar de 50nM a 200nM, sendo que concentrações extracelulares variam de 1µM a 100mM (Cui et al., 2009). O controle da homeostase de cálcio intracelular é orquestrado por diferentes transportadores e canais de $Ca^{2+}$ localizados na membrana plasmática e em diferentes organelas. Em *C. neoformans,* entre os componentes já identificados responsáveis pelo equilíbrio desse íon estão: os canais de cálcio da membrana plasmática Cch1 e Mid1, os transportadores

vacuolares Pmc1 e Vcx1, e o transportador de retículo endoplasmático Eca1 (Liu et al., 2006; Fan et al., 2007; Kmetzsch et al., 2010; Kmetzsch et al., 2013). Frente a estímulo estressor, ocorre um influxo de cálcio intracelular. O aumento da concentração citoplasmática de $Ca^{2+}$ é detectado pela proteína sensora de cálcio calmodulina (CaM), que então ativa a enzima calcineurina, uma serino/treonino fosfatase. A calcineurina é composta por duas subunidades: subunidade A catalítica (Cna1), e B regulatória (Cnb1). O complexo cálcio-CaM se liga na região C-terminal regulatória da subunidade A da calcineurina. Como resultado, uma mudança conformacional libera o sítio ativo da enzima, até então oculto pelo domínio auto-inibitório (Kraus et al., 2005). A fosfatase calcineurina ativada atua de forma ramificada, regulando alvos e controlando processos em nível transcricional e pós-transcricional (Park et al., 2016, 2019; Chow et al., 2017). O principal alvo descrito para calcineurina em *C. neoformans* é o fator de transcrição Crz1. Em sua forma inativa, Crz1 encontra-se fosforilado no citoplasma celular; quando é defosforilado por calcineurina, é ativado e direcionado para o núcleo. Esse fator de transcrição regula a expressão de diversos genes, os quais possuem em sua região promotora sequências canônicas denominadas CDRE, elemento de resposta dependente da calcineurina. Os genes cuja expressão é dependente de calcineurina-Crz1 em *C. neoformans* estão ligados ao transporte de cálcio e de pequenas moléculas, à síntese e manutenção da parede celular, à sensibilidade a temperatura e à virulência (Lev et al., 2012; Park et al., 2016; Chow et al., 2017). Em nível pós-transcricional, foram identificados quatro potenciais alvos da calcineurina: as proteínas ligantes de RNA Pbp1, Puf4 e Lhp1, as quais reconhecem e se ligam a sequências específicas de RNA para controlar processos como localização, estabilidade e função de mRNA, sendo importantes para termotolerância, reprodução e virulência (Park et al., 2016); e a fosfatase Gpp2, a qual é fundamental para a via biossintética de aminoácidos sulfurados (de Melo et al., 2019) (Figura 4).

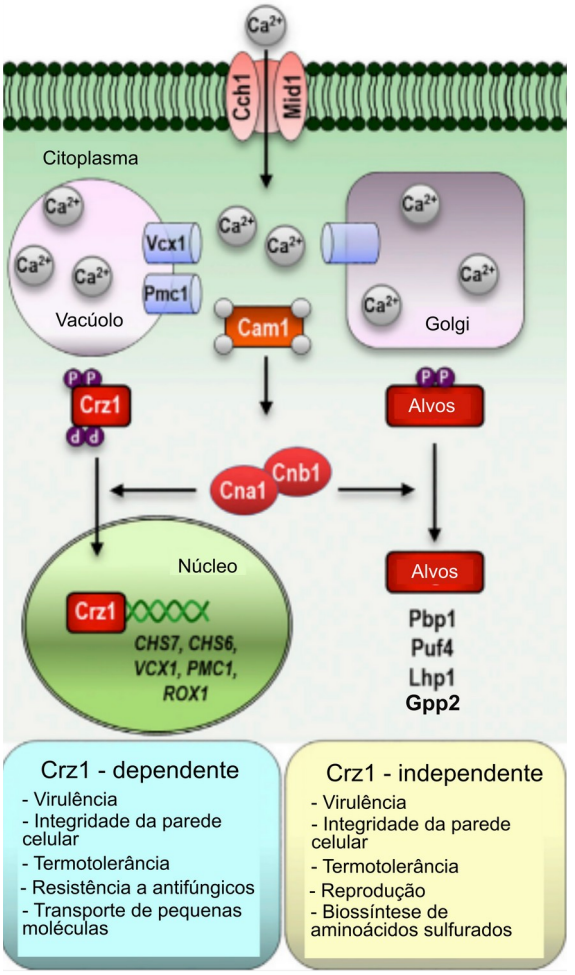



**Figura 4: Principais componentes e funções da via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina em *C. neoformans.*** Um influxo de cálcio ocorre para o citoplasma mediante um estímulo estressor. O aumento da concentração de $Ca^{2+}$ é detectado pela proteína CaM, a qual ativa a fosfatase calcineurina (representada pelas suas subunidades Cna1 e Cnb1). Calcineurina atua de forma ramificada, regulando distintos alvos, sendo Crz1 o melhor caracterizado. Este fator de transcrição regula a homeostase de cálcio, síntese e manutenção da parede celular, transporte de pequenas moléculas, termotolerância e virulência. Pbp1, Puf4, Lhp1 e Gpp2 são potenciais alvos da calcineurina em nível pós-transcricional, independentes de Crz1. Adaptado de Park et al. 2019.

Há inúmeras evidências da importância dos componentes desta via de sinalização para a virulência e sobrevivência de *C. neoformans* no hospedeiro (Odom et al., 1997; Liu et al., 2006; Fan et al., 2007; Kmetzsch et al., 2010; Kmetzsch et al., 2013; Chow et al., 2017; Squizani et al., 2018). Inicialmente, foi

demonstrado que mutantes nulos para a subunidade A da calcineurina apresentam defeitos de desenvolvimento e fenótipo de hipovirulência em modelo murino (Odom et al., 1997). Além disto, mutantes nulos para o transportador de cálcio Cch1 são incapazes de replicar em meio de limitação de cálcio extracelular, e apresentam virulência atenuada em modelo murino de infecção intranasal (Liu et al., 2006). Mutantes nulos para o transportador de cálcio Eca1 demonstram virulência atenuada, sendo também sensíveis a inibidores da calcineurina e ao estresse osmótico de retículo endoplasmático (Fan et al., 2007). Linhagens mutantes nulas para o transportador vacuolar de cálcio Vcx1 apresentam menor secreção de GXM, alteração no perfil de fagocitose por macrófagos murinos, sendo hipovirulentas em modelo de infecção experimental (Kmetzsch et al., 2010). Mutantes duplos para os genes *VCX1* e *PMC1* acumulam cálcio intracelular e apresentam sensibilidade no desenvolvimento a temperatura do hospedeiro. Ainda, mutantes nulos *pmc1* tem a formação de cápsula e secreção de GXM reduzida em meio de cultura de células mamíferas, e redução na virulência e disseminação para o SNC (Kmetzsch et al., 2013). Uma investigação do perfil de expressão global do mutante *pmc1* foi realizada, constatando-se que genes relacionados a produção de urease e formação de cápsula são diferencialmente expressos. No mesmo estudo, foi ainda constatado que o fator de transcrição Crz1 controla a expressão e atividade de urease. Estes dados se relacionam com a ineficiência de transmigração para o SNC observada para o mutante nulo *pmc1* (Squizani et al., 2018). Um dos estudos mais recentes envolvendo análise transcritômica de mutantes para os genes *CRZ1* e *CNA1* verificou que 102 genes são regulados de forma calcineurina-Crz1 dependentes, sendo que 58% deles não possuem caracterização funcional, e o restante está ligado ao transporte de cálcio, produção de ferormônios e remodelagem da parede celular. Ainda, foi constatado que calcineurina e Crz1 também controlam alvos de forma independente, com 393 e 59 genes diferencialmente expressos, respectivamente (Chow et al., 2017).

Os principais componentes dessa cascata de sinalização são conservados entre organismos eucariotos, porém existe variação de alvos dessa rota de sinalização entre diferentes organismos. Em humanos, a via de sinalização cálcio-calcineurina tem, entre várias funções, um papel fundamental na modulação da

resposta imunológica. De forma geral, em fungos e protistas parasitas a via está relacionada a sobrevivência e patogenicidade dos microrganismos. Em humanos, o principal fator de transcrição identificado é o fator nuclear de células T ativadas (NFAT), o qual é homólogo a Crz1 em fungos (Park et al., 2019).

Alguns fármacos que não tem como principal função o controle de infecções fúngicas, mas interferem na via de sinalização cálcio-calcineurina, tem propriedades antifúngicas. Ciclosporina A e FK506 (tracolimus) são clássicos exemplos de moléculas que são usadas como imunossupressoras, mas que possuem atividade antifúngica. A sua ação acontece pela formação de complexo com as imunofilinas ciclofilina A e FKBP, respectivamente, e consecutiva inibição da calcineurina (Odom et al., 1997; Cruz et al., 2000; Liu et al., 2015; Park et al., 2019). Estudos com inibidores da calcineurina vem sendo conduzidos como possíveis tratamentos para MC. Porém, análogos desses inibidores têm sido investigados por mostrarem menor reatividade cruzada com o hospedeiro (revisado por Park et al., 2019). Os componentes da via de uma forma geral tem sido considerados alvos interessantes de investigação para o desenvolvimento de futuros tratamentos (Juvvadi et al., 2017; Park et al., 2019; Wall & Lopez-Ribot, 2020).

### 1.6 Atuais tratamentos para criptococose e suas limitações

O tratamento para indivíduos com criptococose e quadro de MC consiste em 3 fases: indução, consolidação e manutenção. Na fase de indução, o foco do tratamento é a esterilização do fluido cefalorraquidiano, onde os principais fármacos utilizados em conjunto são a anfotericina B e a flucitosina (Sloan & Parris, 2014; Abassi et al., 2015). Ambas as fases de consolidação e manutenção, cujo objetivo é impedir uma recidiva, utilizam principalmente fluconazol, o qual apresenta ação fungistática principal. As concentrações e combinações para o tratamento com os três fármacos principais podem variar dependendo da sua disponibilidade, efetividade e efeitos colaterais causados em pacientes (Sloan & Parris, 2014; Abassi et al., 2015).

Em países de média e baixa renda (MLICs) é comum o uso de fluconazol como monoterapia em todas as fases de tratamento da MC, justamente por serem países com recursos limitados, acarretando em grande dificuldade de acesso a fármacos mais efetivas (Sloan & Parris, 2014; Abassi et al., 2015; Rajasingham et al., 2017). Entretanto, o uso contínuo de fluconazol como único tratamento para MC está associado ao surgimento de linhagens resistentes (revisado em Bermas & Geddes-McAlister, 2020). Além disso, existem inúmeros efeitos adversos associados às medicações indicadas na fase de indução. A anfotericina B, por exemplo, tem alta nefrotoxicidade e pode ainda causar anemia, hipocalemia, hipomagnesemia e flebite (Sloan & Parris, 2014; Abassi et al., 2015). A administração desta medicação necessita de internação hospitalar, o que acarreta em maior custo e utilização de recursos (Abassi et al., 2015). Dentro desse cenário, é necessária a busca por tratamentos alternativos que combinem boa eficácia, baixa toxicidade, baixo custo e fácil acessibilidade (Juvvadi et al., 2017; Park et al., 2019; Wall & Lopez-Ribot, 2020). A exploração de vias de sinalização essenciais para a virulência de *C. neoformans* é uma alternativa muito interessante para definir novos alvos de fármacos que culminem em melhores tratamentos para MC. Como já mencionado, a via de sinalização cálcio-calcineurina vem sendo sugerida como uma excelente opção de exploração (Juvvadi et al., 2017; Park et al., 2019; Wall & Lopez-Ribot, 2020), justamente por ser conectada com a virulência e sobrevivência de *C. neoformans* (Odom et al., 1997; Liu et al., 2006; Fan et al., 2007; Kmetzsch et al., 2010; Kmetzsch et al., 2013; Chow et al., 2017; Squizani et al., 2018).

### 1.7 Biologia de sistemas e a exploração de alvos

Inicialmente, os tratamentos empregados em indivíduos acometidos por alguma enfermidade eram predominantemente baseados em tentativa e erro da aplicação de produtos naturais. Com o avanço científico na área, os princípios ativos presentes em fontes naturais puderam ser purificados e também novos químicos foram sintetizados (Butcher et al. 2004, Danhof et al., 2018). Na segunda metade do século 20, o avanço na pesquisa de novos tratamentos para doenças seguiu uma lógica de único alvo e único fármaco, resultando em considerável

progresso na área, como por exemplo, o desenvolvimento do anti-hipertensivo propranolol (Danhof et al. 2018). Atualmente, essa é ainda a abordagem mais utilizada para a seleção de drogas e delineamento de novos tratamentos, porém hoje é considerada reducionista (Martinez-Mayorga et al., 2020). Este tipo de abordagem tem se mostrado estagnada, com reduzido número de novos fármacos aprovados e novos alvos identificados (Butcher, 2005; Maggiora, 2011, Danhof et al. 2018). Tratamentos com um único fármaco e único alvo são muitas vezes ineficientes ou insuficientes frente à robustez de sistemas biológicos (Maggiora, 2011; Kell, 2013). Nesse sentido, uma visão mais abrangente de sistemas biológicos complexos se faz necessária para o desenvolvimento de tratamentos mais efetivos (Kell, 2013, Danhof et al. 2018). A construção dessa visão mais completa tem avançado na última década pelo significativo aumento na geração de dados multi-ômicos, e integração de informação biológica pela aplicação de biologia de sistemas (Pinu et al., 2019). Uma mudança de perspectiva para análise de múltiplos fármacos e múltiplos alvos vem acontecendo, sendo a integração de ômicas e biologia de sistemas apontadas como importantes ferramentas neste contexto (Maggiora, 2011). Esta nova mudança de paradigma é denominada *systems therapeutics,* a qual tem como alvo redes biológicas com foco no estudo de processos da doença (Danhof et al., 2018).

O melhor entendimento de intrincadas redes biológicas se faz necessário para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes. Considerando os atuais tratamentos para a criptococose e suas limitações abordadas anteriormente, os componentes da via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina representam potenciais alvos de investigação para delineamento de novos e eficientes tratamentos para a criptococose.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Explorar a via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina no intuito de caracterizar componentes não canônicos essenciais para a virulência de *C. neoformans.*

### 2.2 Objetivos específicos

I. Análise de expressão diferencial de dados brutos de RNA-seq dos mutantes nulos *cna1*, *crz1* e *pmc1*, componentes da via de sinalização cálcio-calcineurina;

II. Montagem de redes de interação das proteínas oriundas dos genes diferencialmente expressos por cada mutante selecionado;

III. Análises topológicas e funcionais das redes de interação e seleção de alvo;

IV. Análises de expressão diferencial do alvo selecionado como potencial novo componente da via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina em *C. neoformans*.

## 3. Resultados

Possível revista para submissão: Fugal genetics and

Integrative workflow to identify a new potential member of calcium-calcineurin pathway in *Cryptococcus neoformans*

Tavanti, A.G.[1]; Ferrareze, P.A.G.[1]; Streit, S.R.A.[1]; Feltes, B. C.[2]; Squizani, E.D.[1,]; Motta, H. [1] ; Reuwsaat, J.C.V. [1]; Staats, C.C.[1,3]; Kmetzsch, L. [1,3]

[1] Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

[2] Programa de Pós-Graduação em Computação, Instituto de Informática, UFRGS, Porto Alegre, RS.

[3] Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS.

**Corresponding author**: Lívia Kmetzsch (livia.kmetzsch@ufrgs.br)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Bloco IV, Prédio 43421, Laboratório 222, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil.

**Abstract**

*Cryptococcus neoformans* is a basidiomycetous yeast and the main etiological agent of cryptococcosis in humans. Virulence determinants are essential to successfully establish infection, and the calcium-calcineurin signaling pathway plays fundamental roles for stress adaptation and response to the host environment. The aim of this work is to explore this signaling pathway searching for new potential components. We first performed an *in silico* analysis of raw RNA-seq transcriptomic data from two different studies of the calcium calcineurin pathway to select targets. This analysis allowed the identification of CNAG_00522 gene, which encodes a C2 domain-containing protein probably associated to calcium signaling. Also, transcriptomic and functional enrichment analysis indicate that this gene can be connected to virulence and adaptation to the host environment. We also evaluated the expression profile of this gene in some *in vitro* conditions, which revealed that CNAG_00522 is upregulated by cryptococcal cells exposed to the host temperature. These results suggest that CNAG_00522 gene product may be associated with the calcium-calcineurin pathway. However, additional experiments are necessary in order to confirm this hypothesis and to specify the role of this gene in the virulence of *C. neoformans*.

**Keywords**: *Cryptococcus*, cryptococcosis, calcium-calcineurin pathway, bioinformatics

## 1. Introduction

Invasive fungal infections affect millions of people worldwide (Bongomin et al., 2017). Cryptococcosis is categorized as an acute invasive fungal disease that affects mainly immunocompromised individuals, leading to cryptococcal meningitis (CM) as the most severe presentation (Bongomin et al., 2017; Zavala and Baddley, 2020). *Cryptococcus neoformans* is a basidiomycetous yeast and the main etiological agent of CM (May et al., 2016). This opportunistic pathogen affects immunocompromised people with a higher occurrence among HIV-infected individuals (Molloy et al., 2017; Rajasingham et al., 2017). CM has an estimated incidence of 220,000 cases annually, with more than 181,000 associated deaths (Rajasingham et al., 2017). Sub-Saharan and Southeast Asia countries have the highest occurrence and deaths for this disease, mainly due to the impaired diagnosis and difficulties to access effective treatments (Rajasingham et al., 2017). CM has been suggested to be listed as a Neglected Tropical Disease (NTD) due to the great impact in populations living in low-income countries, and the classification among the most poorly-funded neglected diseases worldwide (Molloy et al., 2017). Current effective treatments for cryptococcosis are expensive and associated with various side effects (Abassi et al., 2015; Rajasingham et al., 2017). In this way, shedding light on the main mechanisms used by *C. neoformans* to establish the disease is vital for the development of better and more accessible treatments (Juvvadi et al., 2017; Park et al., 2019; Wall and Lopez-Ribot, 2020).

Humans come in contact with *C. neoformans* by the inhalation of desiccated yeast cells or basidiospores, mainly originated from pigeon excreta (May et al.,

2016). Under appropriate conditions, the pathogen is able to evade the innate immune response and establishes an infection in the lungs (Denham and Brown, 2018; Griffiths et al., 2012). Yeast cells may then transmigrate via blood stream to the central nervous system (CNS), where such cells may cause meningitis (Denham and Brown, 2018; Griffiths et al., 2012). For proper disease development, cryptococcal cells rely on a set of virulence determinants (Zaragoza, 2019), and the calcium-calcineurin pathway is depicted as crucial for pathogenesis and host adaptation (Chow et al., 2017; Kmetzsch et al., 2013, 2010; Park et al., 2016; Squizani et al., 2018). Calcium is an important messenger that mediates responses to several environment stimuli (Roy et al., 2020). Calcium signals are sensed by calmodulin protein, which activates the phosphatase calcineurin (Park et al., 2019; Roy et al., 2020). Calcineurin recognizes different targets that control a myriad of biological processes in both transcriptional and post-transcriptional levels. The main components of calcium-calcineurin signaling cascade are conserved among eukaryotes, but a great variation of targets is found when comparing distinct organisms (Park et al., 2019). Furthermore, some currently employed treatments for cryptococcosis end up causing various side effects (Abassi et al., 2015) and the calcium-calcineurin signaling pathway has been suggested as an interesting target for the development of new treatments of fungal infections. In this way, novel species-specific components of this pathway are particularly interesting as possibly new drug targets (Juvvadi et al., 2017; Park et al., 2019; Wall and Lopez-Ribot, 2020). This work aims to explore the calcium-calcineurin pathway searching for new potential components of this signaling cascade. To this end, differential gene expression analysis associated with systems biology approach were performed

based on transcriptomic data of mutant strains considered key components of the *C. neoformans* calcium-calcineurin signaling pathway.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Differential gene expression analysis

RNA-Seq libraries of WT, *crz1*Δ and *cna1*Δ grown at 37°C were obtained from a previous study Chow et al. (2017) in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) (Edgar et al., 2002) under the accession number GSE93005. Libraries for WT and *pmc1*Δ also grown at 37°C were obtained from a different previous study (Squizani et al., 2018) in the NCBI SRA database under accession code SRP120588. All libraries were in biological triplicates with the exception of *cna1*Δ, which is composed of two replicates.

Reads from fastq files were evaluated using FastQC software (Andrews, 2010) to check the quality of base calls and to verify adapter presence. Reads from the libraries were aligned to the *C. neoformans* H99 genome and GFF file using STAR software version 2.7.6ª(Dobin et al., 2013), using the following parameters: "--outFilterType BySJout --alignIntronMin 10 --alignIntronMax 3000 --outFilterIntronMotifsRemoveNoncanonical --genomeDir [genome file] --runThreadN 12 --readFilesIn [fastq file] --outFileNamePrefix [output alignment file]". Resulting SAM files were converted to BAM files using SAMtools version 1.7 (Li et al., 2009). Read counting was performed using HTseq software version 0.12.4 (Anders et al., 2015), the parameters used were: "-f bam --stranded=no --type=exon --idattr=locus_tag [bam file] [gff file] > [output count file]" and differential gene

expression analysis was performed in the integrated development environment RStudio (RStudio Team, 2020) using a built script in R language.

### 2.2 Target selection and interaction network construction

Differentially expressed genes (DEGs) lists of each mutant compared to wildtype were submitted individually to perform a protein-protein interaction network (PPIN) assembly in STRING database (Szklarczyk et al., 2019). Due to limited entries of *C. neoformans* H99 proteins in STRING database, the construction of the PPIN was conducted using the *C. neoformans* JEC21 protein codes that are syntenic orthologs to the respective H99 DEGs. Conversion of codes were done using the FungiDB website. In STRING, basic settings were modified regarding active interaction sources: gene fusion and text mining were disabled, as well as adjusting the minimum required interaction score to “low confidence at 0.150”. Also, the maximum number of first shell interactors was adjusted to 200. The resulting networks were exported to TSV files and imported into Cytoscape (Shannon et al., 2003) with “combined interaction score” used as edge attribute. Dynet plug-in (Goenawan et al., 2016) was used to generate an overlap map of each mutant network. The FungiDB website was used to verify annotations, conserved domains and transcriptomic data of proteins present in nodes that were common to all networks and those that were only common to two networks.

### 2.3 Target centralities and function enrichment analysis

Upon selection of a target present in *cna1*Δ and *pmc1*Δ networks, the CentiScaPe plug-in (Scardoni et al., 2014) was used to check for centralities (degree and betweeness) of the selected node in each network. Functional enrichment analysis of the node and its direct and indirect interactors in each network was performed using the ClueGO plug-in (Bindea et al., 2009) to gain insight into which processes that the target may be involved. Default parameters were applied with the exception of enabling “show only pathways with pV ≤ 0.05”. The selected ontologies were Gene Ontology (GO) biological processes (Ashburner et al., 2000) as well as Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways (Kanehisa and Goto, 2000).

### 2.4 Transcription Factors Binding Sites (TFBS) inference

The CNAG_00522 predicted regulatory region, here defined as the region encompassing the 1,000 nucleotides upstream of the transcription start site (TSS), was obtained using the retrieve sequence tool of FungiDB website. Putative Crz1 and Pdr802 motifs were obtained from Chow et al. (2017) and Reuwsaat et al. (2020), respectively. Searches for TFBS were conducted using Find Individual Motifs Occurences (FIMO) version 5.3.0 (Grant et al., 2011). Crz1 and Pdr802 motifs (Supplementary Table 1, sheet 1) were used as motif input and CNAG_00522 promoter region (Supplementary Table 1, sheet 2) was used as sequence input. FIMO matches were filtered considering p-value < 0.0001.

### 2.5 RT-qPCR analysis

The transcript levels of CNAG_00522 were assessed using RT-qPCR from RNA samples collected from H99 strain and the null mutant for *PMC1* gene *(pmc1*), as well as from Kn99 strain and the null mutant for *CRZ1* gene *(crz1*). The methods for RNA extraction and RT-qPCR analysis were the same described by Squizani et al. (2018). Yeast cells were cultured in yeast extract peptone dextrose (YPD) medium for 16h at distinct temperatures (30 ºC and 37 ºC) added or not of calcium (100mM $CaCl_2$).

## 3. Results

### 3.1 Screening of non-canonical components of cryptococcal $Ca^{2+}$-calcineurin pathway

In order to select possible non canonical components of the calcium-calcineurin pathway we employed an integrative workflow composed of different *in silico* methods. First, we evaluated the genome-wide differential gene expression using raw RNA-seq libraries from three mutants of important components of the calcium calcineurin pathway. These libraries refer to mRNA expression profiles of *C. neoformans* WT, and null mutants for genes coding the calcineurin catalytic subunit A (*cna*1Δ), the zinc finger transcription factor Crz1 (*crz1*Δ), and the calcium transporter P-type ATPase Pmc1 (*pmc*1Δ). A list of differentially expressed genes for each mutant was obtained, and the interaction networks were built to identify common nodes. In addition, orthologs of selected targets were explored on FungiDB (Basenko et al., 2018) in order to select new possible components of this signaling pathway. Centralities and functional enrichment analysis were conducted for selected targets, and direct and indirect interactors. Lastly, the expression

profile of the selected target was accessed through RT-qPCR. Figure 1 displays the complete workflow conducted in this study, highlighting *in silico* and *in vitro* approaches.

Differential gene expression analysis was performed using stringent criteria (adjusted p-value < 0.05 and |Log2FoldChange| ≥1) in order to identify genes that are regulated by three components of the calcium-calcineurin pathway. The total numbers of DEGs found to be regulated by Cna1, Crz1 and Pmc1 are 520, 155 and 833, respectively (Supplementary Table 2).

We observed a slight overlap of regulated genes among Crz1, Cna1 and Pmc1 networks, representing about 2 % of the total number of DEGs (Supplementary Figure 1A). Noteworthy, nearly 60 % of the genes positively regulated by Crz1 are also potentially positively regulated by Cna1. However, the overlap between the regulons of Crz1 *vs* Pmc1 or Cna1 *vs* Pmc1 is not so abundant (Supplementary Figure 1B). Furthermore, no overlap was observed among Crz1, Cna1 and Pmc1 negatively regulated DEGs (Supplementary Figure 1C).

In order to find non-canonical proteins associated with the calcium-calcineurin pathway, we performed a protein-protein interaction network analysis using the selected DEGs. The final Pmc1, Cna1 and Crz1 networks were composed of 693 nodes (493 DEGs) and 20,726 edges, 330 nodes (130 DEGs) and 6,217 edges, and 242 (42 DEGs) and 5,488 edges, respectively. We focused in nodes that were not yet functionally annotated, with well-defined conserved domains (i.e. domains that potentially link them to the calcium signaling pathway), and available transcriptomic data related to virulence and survival. Based on the

above criteria and on the PPINs analysis assembled from the corresponding DEGs, we selected CNAG_00522 as a new potential member of the calcium calcineurin pathway. This target was found to be common to *pmc1*Δ and *cna1*Δ PPIN, and positively regulated by these genes. This gene product harbors a C2B_Tricalbin-like domain, which is characteristic of proteins involved in membrane trafficking and sorting (Lu et al., 2020). This domain is related to $Ca^{2+}$-dependent membrane-targeting modules that binds different molecules, as phospholipids, inositol polyphosphates and intracellular proteins (Lu et al., 2020). Moreover, transcriptomic data suggested that this gene may be important for survival and fitness of *C. neoformans* (Chen et al., 2014; Derengowski et al., 2013; Trevijano-Contador et al., 2018). Centrality analysis revealed that the CNAG_00522, an ortholog of *C. neoformans* JEC21 CNA05040, is a bottleneck gene in *cna1*Δ PPIN. Additional investigation of representative pathways by functional enrichment analysis showed that this target and its interactors are connected to basal cell processes such as oxidative stress, energy production and carbohydrates metabolism in both networks (Figure 2).

### 3.2 Expression analysis of CNAG_00522

In order to validate our inference of CNAG_00522 as a new member of the calcium-calcineurin pathway, we performed RT-qPCR analysis to evaluate the expression of this gene under conditions that trigger cellular responses using this signaling cascade (37 ˚C in the presence or absence of $Ca^{2+}$). Moreover, the dependence of Pmc1 as well as Crz1 to regulate the expression of this gene was also evaluated. The relative transcript levels of CNAG_00522 were increased when

WT fungal cells were cultured in 37 ˚C compared to 25 ˚C (Figure 3A). However, addition of $Ca^{2+}$ reduced the transcript levels to those observed in control conditions. The same pattern was observed for mutant cells lacking *CRZ1* (Figure 3B). Interestingly, CNAG_00522 transcript levels were significantly higher in *crz1* null mutant in comparison to WT, suggesting that Crz1 may act as a negative regulator of this gene. We also found that proper expression of CNAG_00522 depends upon the presence of the calcium transporter Pmc1 (Figure 3C).

The expression profile of CNAG_00522 prompted us to evaluate the presence of canonical sequences in the regulatory region of this gene that could indicate a direct regulation by Crz1 and/or other transcription factors. FIMO analysis reported three TFBS in CNAG_00522 promoter region with p-value < 0.0001: one referring to a Crz1-biding motif, and two referring to Pdr802-biding motifs (Figure 4 and Supplementary Table 3). Crz1 was chosen due to the direct association with the calcium-calcineurin pathway and regulation of genes related to stress tolerance, pathogenicity and virulence (Cramer et al., 2008; Kim et al., 2010; Lev et al., 2012; Santos and de Larrinoa, 2005; Schumacher et al., 2008). Pdr802 is a transcription factor that negatively regulates Titan cell formation and is also essential for *C. neoformans* virulence. Direct targets of Pdr802 include the calcineurin targets Had1 and Pmc1, and null mutant cells accumulate intracellular calcium (Reuwsaat et al., 2020). These findings reinforce the role of CNAG_00522 on calcium-calcineurin signaling pathway.

## 4. Discussion

The study of complex biological systems have been facilitated by the rising of multiomic data, which enables the integration of biological information through system biology approaches (Junqueira et al. 2014; Pinu et al., 2019). In this context, the workflow employed in this study might be useful to shed light into components of intricate biological systems, as those exemplified here. Based on the criteria that non-canonical genes to be associated with calcium-calcineurin pathway could not be functionally characterized before, we selected CNAG_00522 as a starting point. Considering the conserved domain identified in the CNAG_00522 coding sequence, it is possible to speculate that this protein is responsive to $Ca^{2+}$ signals, and also connected with vesicle formation (Lu et al., 2020). The polysaccharide glucuronoxylomannan (GXM), one of the main components of *C. neoformans* capsule, is transported by vesicles and secreted during infection, performing an immunoregulatory role in the host (Rodrigues et al., 2008, 2007; Zaragoza et al., 2009). The deletion of calcium transporters possibly influences GXM secretion (Kmetzsch et al., 2013, 2010), indicating a potential connection between calcium signaling and polysaccharide transport. However, additional functional analyses are necessary to evaluate the role of this gene product in the secretion of extracellular vesicles containing GXM.

Transcriptomic data suggest that this gene could be important for survival in the host and in the environment. CNAG_00522 is upregulated in fungal cells cultivated in conditions of Titan cells induction (Trevijano-Contador et al. 2018). This morphotype confers resistance to the host environment and is important for *C. neoformans* virulence (Denham and Brown, 2018; Griffiths et al., 2012). Moreover, CNAG_00522 is also upregulated in *C. neoformans* cells internalized by the natural

predator *Acanthamoeba castellanii* (Derengowski et al. 2013), and in cryptococcal cells recovered from cerebrospinal fluid (CSF) of infected patients (Chen et al., 2014). Additionally, the promoter region of CNAG_00522 has putative Crz1 and Pdr802 binding sequences, indicating a connection with stress response, survival and formation of Titan cells in *C. neoformans* (Park et al., 2019, 2016; Reuwsaat et al., 2020).

The CNAG_00522 product is a bottleneck in *cna*1 PPIN. Bottleneck proteins usually represent important connectors that may have an essential role in the network (Yu et al., 2007). Thus, this gene protein could be connecting essential processes for the adaptation of *C. neoformans* to different stresses and host environment. The host milieu challenges yeast survival with processes such as oxidative stress and nutritional limitation (Griffiths et al., 2012). The results from the function enrichment analysis linked ontologies related to these types of stress to CNAG_00522 and its interactors. Moreover, we observed that the CNAG_00522 expression is possibly thermoregulated, since the transcript levels of this gene are higher in cultures at 37ºC compared to 25 ºC. Our RT-qPCR data also suggested that Crz1 is a negative regulator of this gene. However, CNAG_00522 was not identified as differentially expressed in the *crz1* mutant RNA-seq library, possibly due to differences in the cultivation conditions used. We also found that the expression of CNAG_00522 depends on the presence of the vacuolar calcium transporter Pmc1, validating the results obtained in the analysis of differential expression. Thus, we hypothesize that CNAG_00522 participates in important processes that pertain virulence and pathogenicity in *C. neoformans* that are linked

to the calcium-calcineurin pathway. However, functional assays will be necessary to prove the participation of CNAG_00522 in this signaling pathway.

**Acknowledgments**

We are thankful to the colleagues and Professors that aided in different steps of this project. We are greatful to Fábio Carrer Andreis for helping in the *in silico* experiments, Daiane Acosta Falcão and Julia Sperotto for assistance in *in vitro* experiments. We are also grateful to Dr. Marilene Henning Vainstein, Dr. Arnaldo Zaha and Livia Fratini Dutra for comments on the manuscript. This project was financially supported through grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil) to Lívia Kmetzsch. CAPES fully supported Andrea Gomes Tavanti during this study through a scholarship of Programa de Excelência Acadêmica (PROEX) number 88882.346632/2019-01.

**Conflicts of interest**

The authors declare no conflict of interest

**References**

Abassi, M., Boulware, D.R., Rhein, J., 2015. Cryptococcal Meningitis: Diagnosis and Management Update. Curr. Trop. Med. Reports 2, 90–99. https://doi.org/10.1007/s40475-015-0046-y

Agarwala, R., Barrett, T., Beck, J., Benson, D.A., Bollin, C., Bolton, E., Bourexis, D., Brister, J.R., Bryant, S.H., Canese, K., Cavanaugh, M., Charowhas, C., Clark, K., Dondoshansky, I., Feolo, M., Fitzpatrick, L., Funk, K., Geer, L.Y., Gorelenkov, V., Graeff, A., Hlavina, W., Holmes, B., Johnson, M., Kattman, B., Khotomlianski, V., Kimchi, A., Kimelman, M., Kimura, M., Kitts, P., Klimke, W., Kotliarov, A., Krasnov, S., Kuznetsov, A., Landrum, M.J., Landsman, D., Lathrop, S., Lee, J.M., Leubsdorf, C., Lu, Z., Madden, T.L., Marchler-Bauer,

A., Malheiro, A., Meric, P., Karsch-Mizrachi, I., Mnev, A., Murphy, T., Orris, R., Ostell, J., O'Sullivan, C., Palanigobu, V., Panchenko, A.R., Phan, L., Pierov, B., Pruitt, K.D., Rodarmer, K., Sayers, E.W., Schneider, V., Schoch, C.L., Schuler, G.D., Sherry, S.T., Siyan, K., Soboleva, A., Soussov, V., Starchenko, G., Tatusova, T.A., Thibaud-Nissen, F., Todorov, K., Trawick, B.W., Vakatov, D., Ward, M., Yaschenko, E., Zasypkin, A., Zbicz, K., 2018. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res. 46, D8–D13. https://doi.org/10.1093/nar/gkx1095

Anders, S., Pyl, P.T., Huber, W., 2015. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics 31, 166–169.

Andrews S., 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc

Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G., 2000. Gene Ontology : tool for the. Gene Expr. 25, 25–29.

Basenko, E.Y., Pulman, J.A., Shanmugasundram, A., Harb, O.S., Crouch, K., Starns, D., Warrenfeltz, S., Aurrecoechea, C., Stoeckert, C.J., Kissinger, J.C., Roos, D.S., Hertz-Fowler, C., 2018. FungiDB: An integrated bioinformatic resource for fungi and oomycetes. J. Fungi 4, 1–28. https://doi.org/10.3390/jof4010039

Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.H., Pagès, F., Trajanoski, Z., Galon, J., 2009. ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. Bioinformatics 25, 1091–1093. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp101

Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R.O., Denning, D.W., 2017. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. J. Fungi 3. https://doi.org/10.3390/jof3040057

Chen, Y., Toffaletti, D.L., Tenor, J.L., Litvintseva, A.P., Fang, C., Mitchell, T.G., McDonald, T.R., Nielsen, K., Boulware, D.R., Bicanic, T., Perfect, J.R., 2014. The Cryptococcus neoformans transcriptome at the site of human meningitis. MBio 5, 1–10. https://doi.org/10.1128/mBio.01087-13

Chow, E.W.L., Clancey, S.A., Billmyre, R.B., Averette, A.F., Granek, J.A., Mieczkowski, P., Cardenas, M.E., Heitman, J., 2017. Elucidation of the

calcineurin-Crz1 stress response transcriptional network in the human fungal pathogen Cryptococcus neoformans. PLoS Genet. 13, 1–29.

Cramer, R.A., Perfect, B.Z., Pinchai, N., Park, S., Perlin, D.S., Asfaw, Y.G., Heitman, J., Perfect, J.R., Steinbach, W.J., 2008. Calcineurin target CrzA regulates conidial germination, hyphal growth, and pathogenesis of Aspergillus fumigatus. Eukaryot. Cell 7, 1085–1097. https://doi.org/10.1128/EC.00086-08

Denham, S.T., Brown, J.C.S., 2018. Mechanisms of pulmonary escape and dissemination by cryptococcus neoformans. J. Fungi 4. https://doi.org/10.3390/jof4010025

Derengowski, L. da S., Paes, H.C., Albuquerque, P., Tavares, A.H.F.P., Fernandes, L., Silva-Pereira, I., Casadevall, A., 2013. The transcriptional response of cryptococcus neoformans to ingestion by Acanthamoeba castellanii and macrophages provides insights into the evolutionary adaptation to the mammalian host. Eukaryot. Cell 12, 761–774. https://doi.org/10.1128/EC.00073-13

Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T.R., 2013. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics 29, 15–21. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635

Edgar, R., Domrachev, M., Lash, A.E., 2002. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. Nucleic Acids Res. 30, 207–210. https://doi.org/10.1093/nar/30.1.207

Goenawan, I.H., Bryan, K., Lynn, D.J., 2016. DyNet: Visualization and analysis of dynamic molecular interaction networks. Bioinformatics 32, 2713–2715. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw187

Grant, C.E., Bailey, T.L., Noble, W.S., 2011. FIMO: Scanning for occurrences of a given motif. Bioinformatics 27, 1017–1018. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr064

Griffiths, E.J., Kretschmer, M., Kronstad, J.W., 2012. Aimless mutants of Cryptococcus neoformans: Failure to disseminate. Fungal Biol. Rev. 26, 61–72.

Kim, S., Hu, J., Oh, Y., Park, J., Choi, J., Lee, Y.H., Dean, R.A., Mitchell, T.K., 2010. Combining chip-chip and expression profiling to model the MoCRZ1 mediated circuit for Ca2+/calcineurin signaling in the rice blast fungus. PLoS Pathog. 6, 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000909

Junqueira, D. M., Braun, R. L., Verli, H., 2014. Alinhamentos, in: Verli, H. (Org.), Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, São Paulo, p. 39.

Juvvadi, P.R., Lee, S.C., Heitman, J., Steinbach, W.J., 2017. Calcineurin in fungal virulence and drug resistance: Prospects for harnessing targeted inhibition of calcineurin for an antifungal therapeutic approach. Virulence 8, 186–197.

Kanehisa M, Goto S., 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res. 28(1):27-30. doi:10.1093/nar/28.1.27

Kmetzsch, L., Staats, C.C., Cupertino, J.B., Fonseca, F.L., Rodrigues, M.L., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2013. The calcium transporter Pmc1 provides Ca2+ tolerance and influences the progression of murine cryptococcal infection. FEBS J. 280, 4853–4864. https://doi.org/10.1111/febs.12458

Kmetzsch, L., Staats, C.C., Simon, E., Fonseca, F.L., de Oliveira, D.L., Sobrino, L., Rodrigues, J., Leal, A.L., Nimrichter, L., Rodrigues, M.L., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2010. The vacuolar Ca2+ exchanger vcx1 is involved in calcineurin-dependent Ca2+ tolerance and virulence in Cryptococcus neoformans. Eukaryot. Cell 9, 1798–1805.

Kwon-chung, K.J., Fraser, J.A., Doering, T.L., Wang, Z.A., Janbon, G., Idnurm, A., Bahn, Y., 2014. Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. Cold Spring Harb. Prespectives Med. 4, a019760.

Leinonen, R., Sugawara, H., Shumway, M., 2011. The sequence read archive. Nucleic Acids Res. 39, 2010–2012.

Lev, S., Desmarini, D., Chayakulkeeree, M., Sorrell, T.C., Djordjevic, J.T., 2012. The Crz1/Sp1 Transcription Factor of Cryptococcus neoformans Is Activated by Calcineurin and Regulates Cell Wall Integrity. PLoS One 7. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051403

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics 25, 2078–2079. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352

Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C.J., Marchler-Bauer, A., 2020. CDD/SPARCLE: The conserved domain database in 2020. Nucleic Acids Res. 48, D265–D268. https://doi.org/10.1093/nar/gkz991

May, R.C., Stone, N.R.H., Wiesner, D.L., Bicanic, T., Nielsen, K., 2016. Cryptococcus: From environmental saprophyte to global pathogen. Nat. Rev. Microbiol. 14, 106–117. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6

Molloy, S.F., Chiller, T., Greene, G.S., Burry, J., Govender, N.P., Kanyama, C., Mfinanga, S., Lesikari, S., Mapoure, Y.N., Kouanfack, C., Sini, V., Temfack, E., Boulware, D.R., Dromer, F., Denning, D.W., Day, J., Stone, N.R.H., Bicanic, T., Jarvis, J.N., Lortholary, O., Harrison, T.S., Jaffar, S., Loyse, A., 2017. Cryptococcal meningitis: A neglected NTD? PLoS Negl. Trop. Dis. 11, 1–7. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005575

Park, H.S., Chow, E.W.L., Fu, C., Soderblom, E.J., Moseley, M.A., Heitman, J., Cardenas, M.E., 2016. Calcineurin Targets Involved in Stress Survival and Fungal Virulence. PLoS Pathog. 12, 1–28. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005873

Park, H.S., Lee, S.C., Cardenas, M.E., Heitman, J., 2019. Calcium-Calmodulin-Calcineurin Signaling: A Globally Conserved Virulence Cascade in Eukaryotic Microbial Pathogens. Cell Host Microbe 26, 453–462. https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.08.004

Pinu, F.R., Beale, D.J., Paten, A.M., Kouremenos, K., Swarup, S., Schirra, H.J., Wishart, D., 2019. Systems biology and multi-omics integration: Viewpoints from the metabolomics research community. Metabolites 9, 1–31. https://doi.org/10.3390/metabo9040076

Rajasingham, R., Smith, R.M., Park, B.J., Jarvis, J.N., Govender, N.P., Chiller, T.M., Denning, D.W., Loyse, A., Boulware, D.R., 2017. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. Lancet Infect. Dis. 17, 873–881. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8

Reuwsaat, J., Agustinho, D., Motta, H., Brown, H., Chang, A., Brent, M.R., Kmetzsch, L., Doering, T., 2020. The transcription factor Pdr802 regulates Cryptococcus neoformans Titan cell production and pathogenicity. bioRxiv - Prepr.

Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., Oliveira, D.L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J.D., Almeida, I.C., Casadevall, A., 2008. Extracellular vesicles produced by Cryptococcus neoformans contain protein components associated with virulence. Eukaryot. Cell 7, 58–67. https://doi.org/10.1128/EC.00370-07

Rodrigues, M.L., Nimrichter, L., Oliveira, D.L., Frases, S., Miranda, K., Zaragoza, O., Alvarez, M., Nakouzi, A., Feldmesser, M., Casadevall, A., 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. https://doi.org/10.1128/EC.00318-06

Roy, A., Kumar, A., Baruah, D., Tamuli, R., 2020. Calcium signaling is involved in diverse cellular processes in fungi. Mycology 00, 1–15.

RStudio Team, 2020. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL

Santos, M., de Larrinoa, I.F., 2005. Functional characterization of the Candida albicans CRZ1 gene encoding a calcineurin-regulated transcription factor. Curr. Genet. 48, 88–100. https://doi.org/10.1007/s00294-005-0003-8

Scardoni, G., Tosadori, G., Faizan, M., Spoto, F., Fabbri, F., Laudanna, C., 2014. Biological network analysis with CentiScaPe: centralities and experimental dataset integration. F1000Research 3, 139.

Schumacher, J., De Larrinoa, I.F., Tudzynski, B., 2008. Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor CRZ1 of Botrytis cinerea is required for growth, development, and full virulence on bean plants. Eukaryot. Cell 7, 584–601. https://doi.org/10.1128/EC.00426-07

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., 2003. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models. Genome Res. 13, 426. https://doi.org/10.1101/gr.1239303.metabolite

Squizani, E.D., Oliveira, N.K., Reuwsaat, J.C.V., Marques, B.M., Lopes, W., Gerber, A.L., de Vasconcelos, A.T.R., Lev, S., Djordjevic, J.T., Schrank, A., Vainstein, M.H., Staats, C.C., Kmetzsch, L., 2018. Cryptococcal dissemination to the central nervous system requires the vacuolar calcium transporter Pmc1. Cell. Microbiol. 20, 1–13. https://doi.org/10.1111/cmi.12803

Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., Jensen, L.J., Von Mering, C., 2019. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. Nucleic Acids Res. 47, D607–D613. https://doi.org/10.1093/nar/gky1131

Trevijano-Contador, N., de Oliveira, H.C., García-Rodas, R., Rossi, S.A., Llorente, I., Zaballos, Á., Janbon, G., Ariño, J., Zaragoza, Ó., 2018. Cryptococcus neoformans can form titan-like cells in vitro in response to multiple signals, PLoS Pathogens. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007007

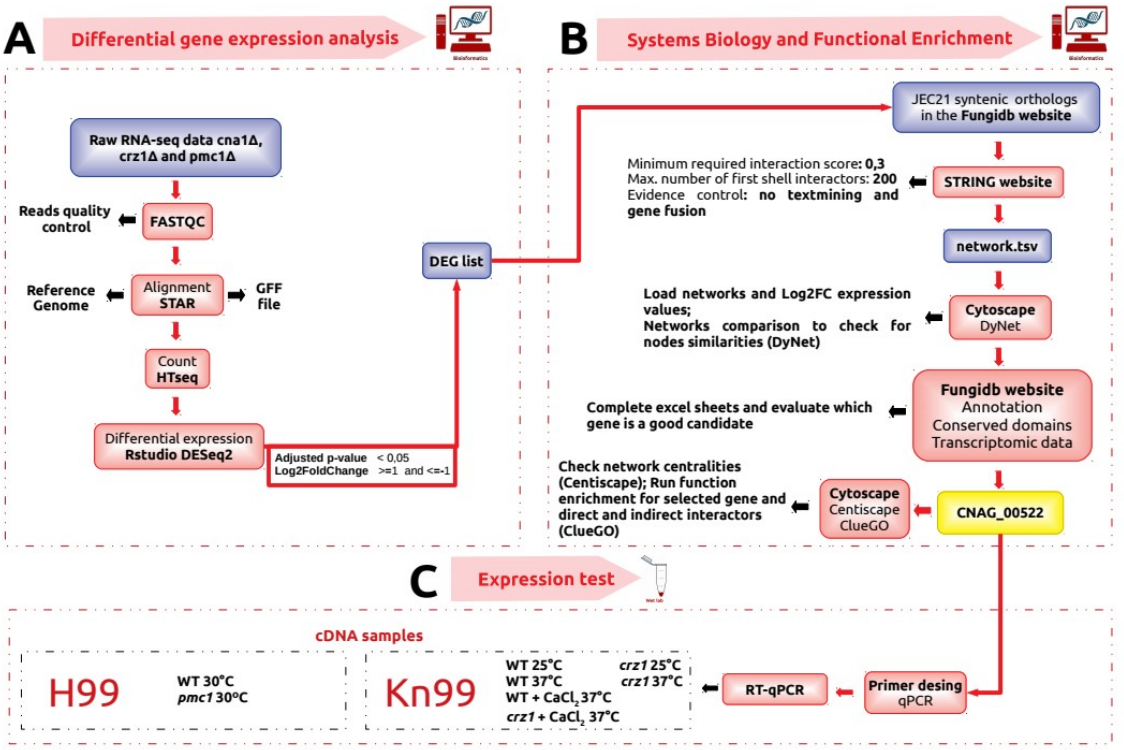
Wall, G., Lopez-Ribot, J.L., 2020. Current antimycotics, new prospects, and future approaches to antifungal therapy. Antibiotics 9, 1–10. https://doi.org/10.3390/antibiotics9080445

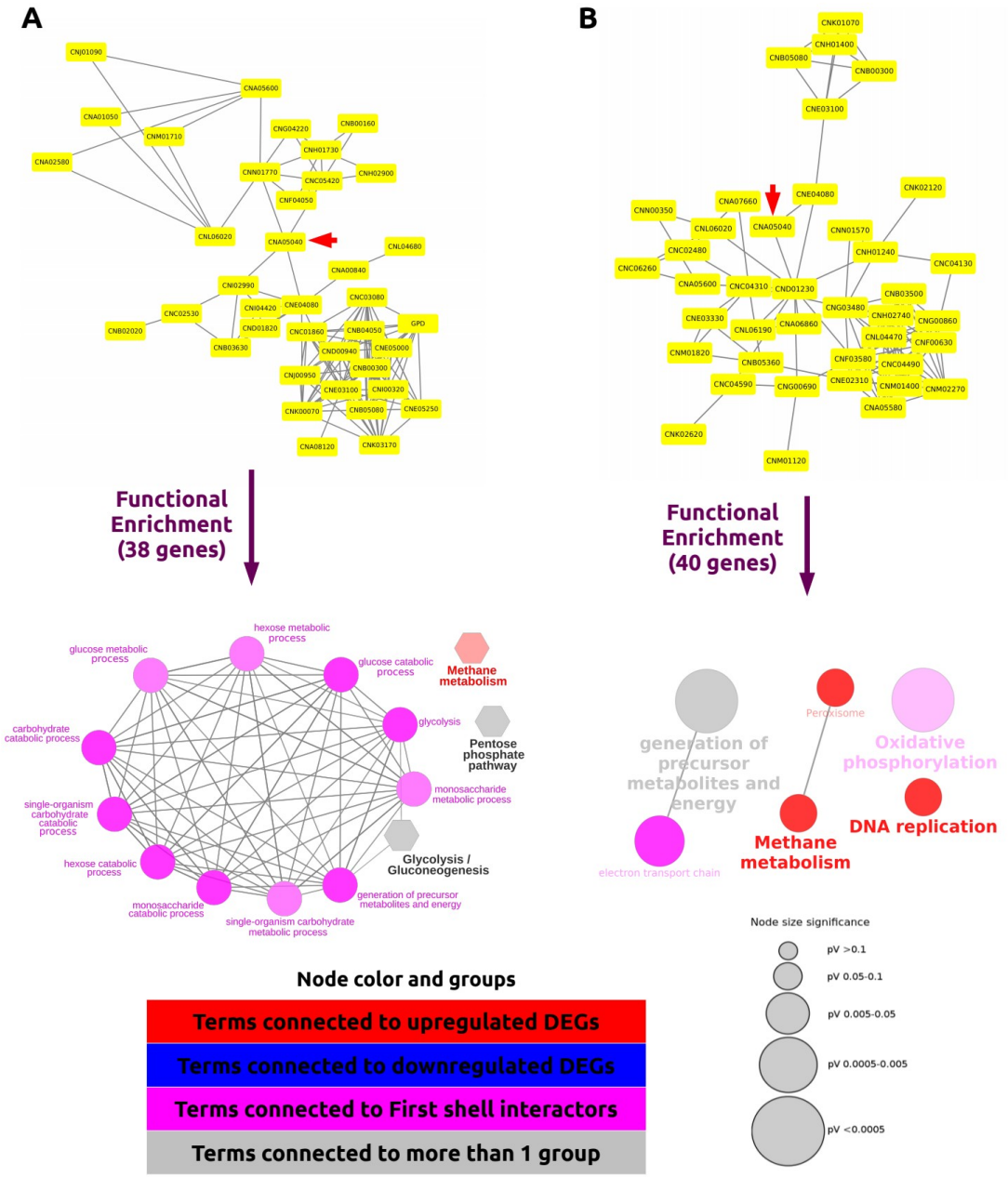
Yu, H., Kim, P.M., Sprecher, E., Trifonov, V., Gerstein, M., 2007. The importance of bottlenecks in protein networks: Correlation with gene essentiality and expression dynamics. PLoS Comput. Biol. 3, 713–720. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030059

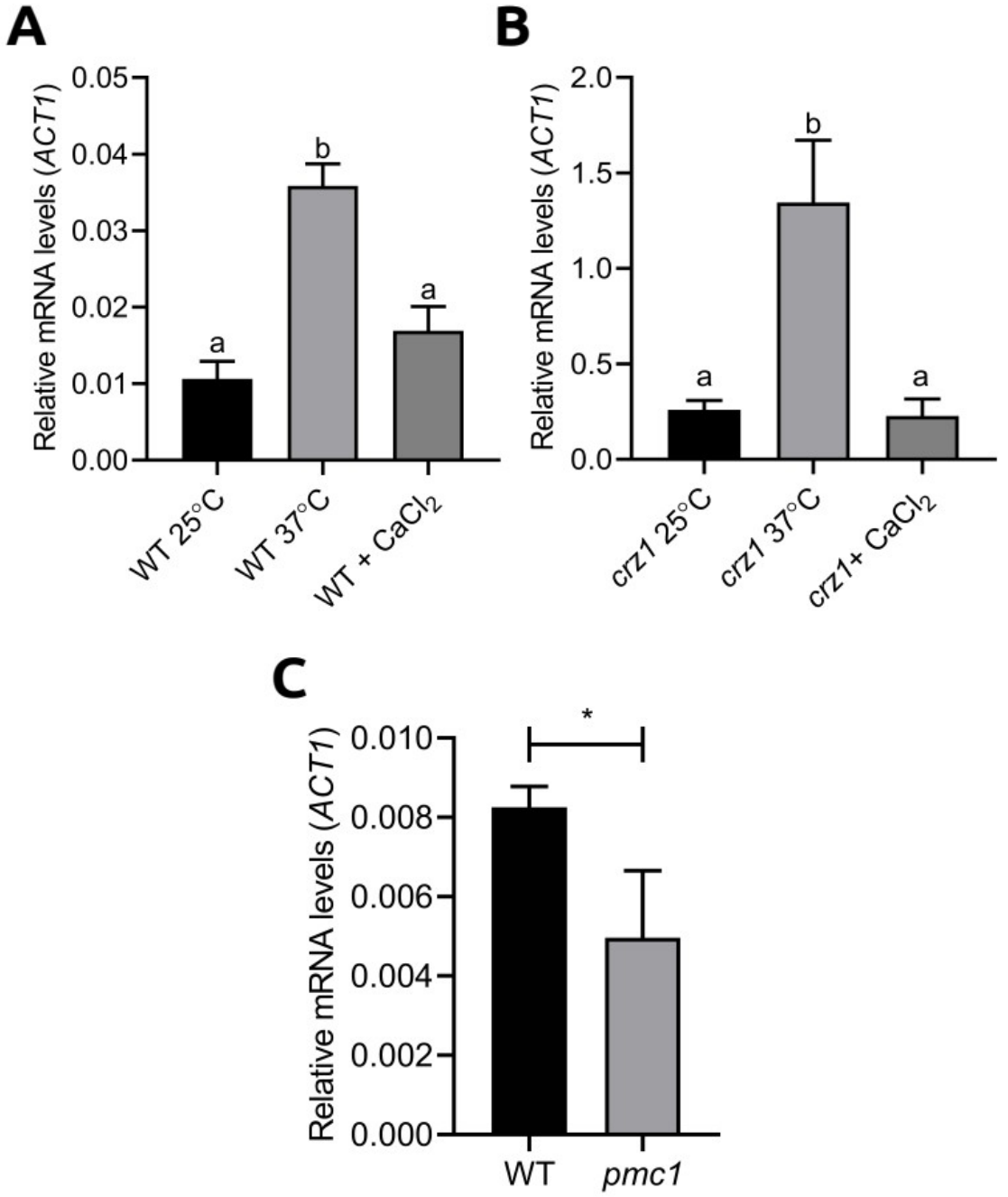
Zaragoza, O., 2019. Basic principles of the virulence of Cryptococcus. Virulence 10, 490–501. https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1614383

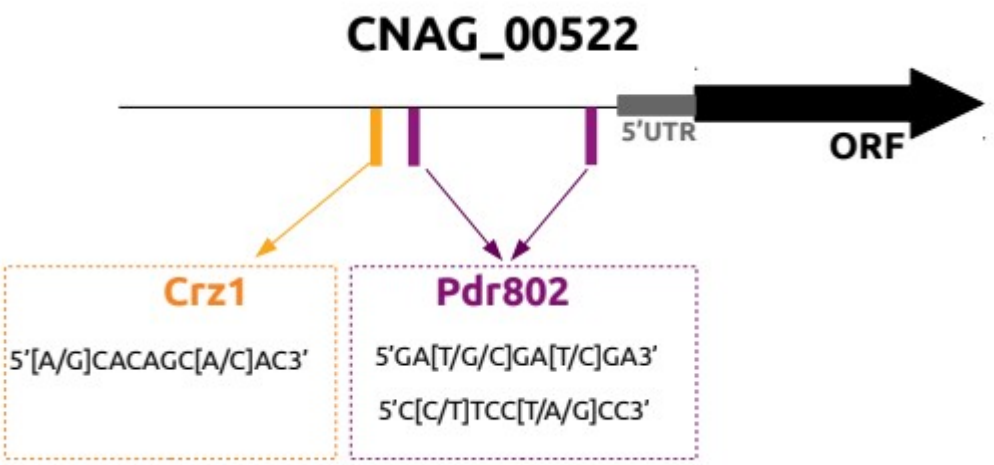
Zaragoza, O., Rodrigues, M.L., De Jesus, M., Frases, S., Dadachova, E., Casadevall, A., 2009. Chapter 4 The Capsule of the Fungal Pathogen Cryptococcus neoformans, 1st ed, Advances in Applied Microbiology. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)01204-0

Zavala, S., Baddley, J.W., 2020. Cryptococcosis. Semin. Respir. Crit. Care Med. 41, 69–79.


A
Differential gene expression analysis
Raw RNA-seq data cna1Δ, crz1Δ and pmc1Δ
Reads quality control
FASTQC
Reference Genome
Alignment STAR
GFF file
Count HTseq
Differential expression Rstudio DESeq2
Adjusted p-value < 0,05
Log2FoldChange >=1 and <=-1
DEG list
B
Systems Biology and Functional Enrichment
JEC21 syntenic orthologs in the Fungidb website
Minimum required interaction score: 0,3
Max. number of first shell interactors: 200
Evidence control: no textmining and gene fusion
STRING website
network.tsv
Load networks and Log2FC expression values;
Networks comparison to check for nodes similarities (DyNet)
Cytoscape DyNet
Fungidb website
Annotation
Conserved domains
Transcriptomic data
Complete excel sheets and evaluate which gene is a good candidate
Check network centralities (Centiscape); Run function enrichment for selected gene and direct and indirect interactors (ClueGO)
Cytoscape Centiscape ClueGO
CNAG_00522
C
Expression test
cDNA samples
H99
WT 30°C
pmc1 30°C
Kn99
WT 25°C
WT 37°C
WT + CaCl2 37°C
crz1 + CaCl2 37°C
crz1 25°C
crz1 37°C
RT-qPCR
Primer desing qPCR


A
B
Functional Enrichment (38 genes)
Functional Enrichment (40 genes)
hexose metabolic process
glucose metabolic process
glucose catabolic process
Methane metabolism
carbohydrate catabolic process
glycolysis
Pentose phosphate pathway
single-organism carbohydrate catabolic process
monosaccharide metabolic process
hexose catabolic process
Glycolysis / Gluconeogenesis
monosaccharide catabolic process
generation of precursor metabolites and energy
single-organism carbohydrate metabolic process
Peroxisome
Oxidative phosphorylation
generation of precursor metabolites and energy
DNA replication
Methane metabolism
electron transport chain
Node color and groups
Terms connected to upregulated DEGs
Terms connected to downregulated DEGs
Terms connected to First shell interactors
Terms connected to more than 1 group
Node size significance
pV >0.1
pV 0.05-0.1
pV 0.005-0.05
pV 0.0005-0.005
pV <0.0005


A
Relative mRNA levels (ACT1)
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
a
b
a
WT 25°C
WT 37°C
WT + CaCl2
B
Relative mRNA levels (ACT1)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
a
b
a
crz1 25°C
crz1 37°C
crz1+ CaCl2
C
Relative mRNA levels (ACT1)
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
*
WT
pmc1


CNAG_00522
5'UTR
ORF
Crz1
5'[A/G]CACAGC[A/C]AC3'
Pdr802
5'GA[T/G/C]GA[T/C]GA3'
5'C[C/T]TCC[T/A/G]CC3'

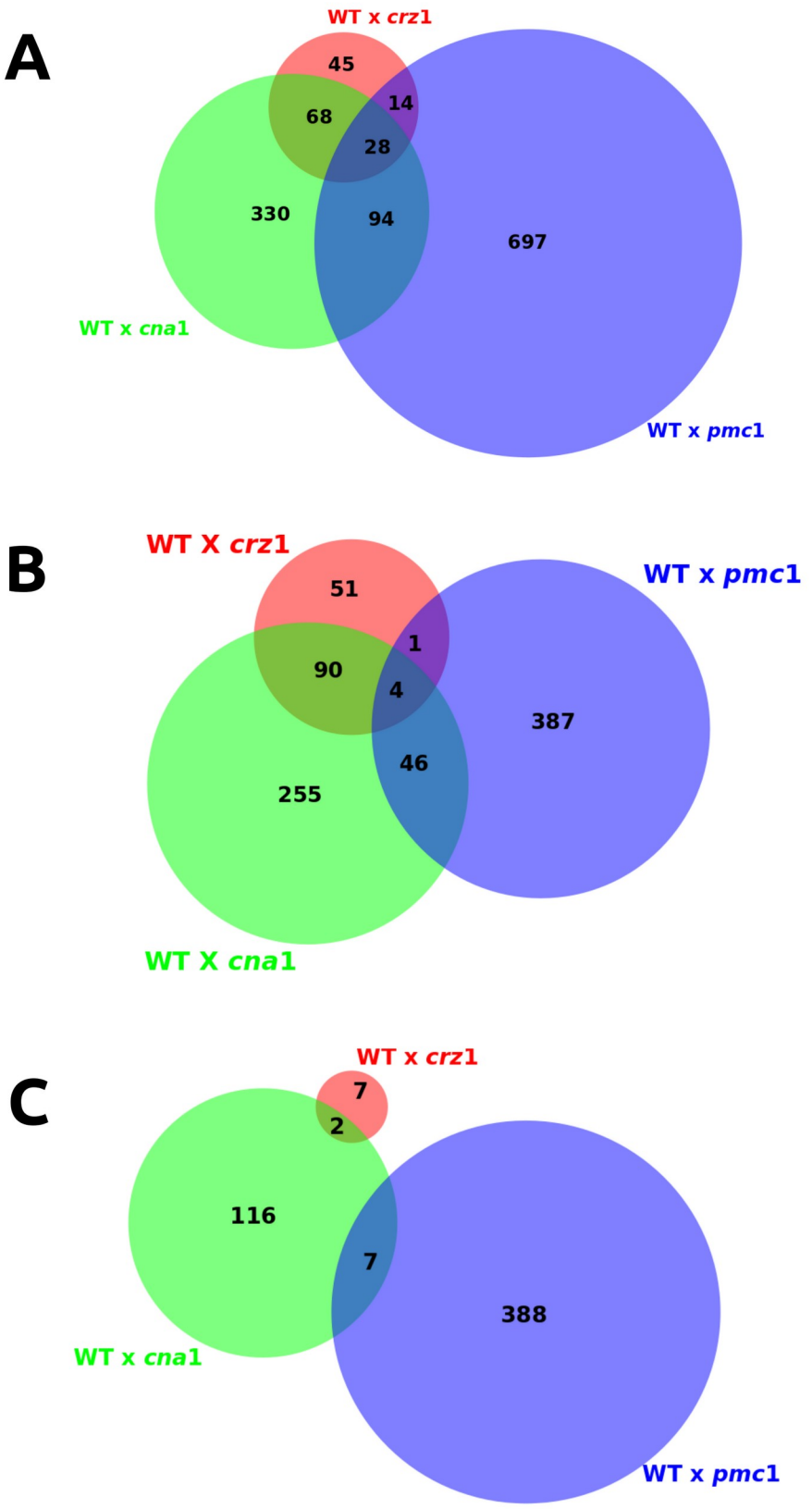

A
WT x crz1
45
14
68
28
330
94
697
WT x cna1
WT x pmc1
B
WT X crz1
WT x pmc1
51
1
90
4
387
46
255
WT X cna1
C
WT x crz1
7
2
116
7
388
WT x cna1
WT x pmc1

**Figure 1: General workflow used to identify new potential components of the $Ca^{2+}$-calcineurin signaling pathway in *C. neoformans*.** A – Differential gene expression analysis, input files (blue) and software (red). B – Systems biology and functional enrichment analysis, input files (blue), softwares/websites (red) and selected target (yellow). C – RT-qPCR analysis, cDNA samples used to test CNAG_00522 expression (black).

**Figure 2: Networks and Functional Enrichment Analysis.** Red arrows indicate CNAG_00522 (represented by its ortholog in JEC21 strain, CNA05040) in both networks. A) Part of CNA1 network showing CNAG_00522 and its direct and indirect interactors (40 genes in total). Bottom side shows functional enrichment. B) Part of PMC1 network showing CNAG_00522 and its direct and indirect interactors (38 genes in total). Bottom side show functional enrichment.

**Figure 3: CNAG_00522 expression is temperature-regulated in *C. neoformans*.** Transcript levels of CNAG_00522 was assessed by RT-qPCR. A - CNAG_00522 transcript levels in Kn99 strain (WT) at 25°C, or at 37°C with or without $CaCl_2$ . B - CNAG_00522 transcript levels in *crz*1 samples at 25°C, or at 37°C with or without $CaCl_2$. C - CNAG_00522 transcript levels in H99 strain (WT) at 30°C or *pmc*1 mutant at 30°C. Error bars indicate standard deviation. Statistical analysis was conducted using Student's t test. *$p < 0.05$. B - Statistical analysis was conducted using one-way analysis of variance (ANOVA).

**Figure 4: CNAG_00522 promoter region and transcription factor binding sites of Crz1 and Pdr802.** Black line represents the promoter region of CNAG_00522. Orange and purple rectangles represent Crz1 and Pdr802 binding sites, respectively.

**Supplementary Figure 1:** Venn diagrams of DEGs. A – Venn diagram comparing the total number of DEGs for WT x *pmc1*, WT x *cna1* and WT x *crz1*. B – Venn diagram comparing the number of positively regulated DEGs for WT x *pmc1*, WT x *cna1* and WT x *crz1*. C – Venn diagram comparing the number of negatively regulated DEGs for WT x *pmc1*, WT x *cna1* and WT x *crz1*.

## 4. Discussão

A importância e o impacto que análises integradas de dados ômicos e biologia de sistemas podem ter na compreensão de sistemas biológicos complexos é de grande relevância (Maggiora, 2011; Pinu et al., 2019). Esse tipo de abordagem conjunta tem sido considerada essencial para a procura de novos fármacos e desenvolvimento de tratamentos inovadores para diferentes doenças (Kell, 2013; Maggiora, 2011).

A via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina foi extensamente estudada e associada à sobrevivência e virulência de microrganismos eucariotos patogênicos (revisado por Park et al., 2019). Apesar da conservação dos principais componentes dessa via entre diferentes espécies fúngicas, há ampla variação de alvos (revisado por Park et al., 2019). Em *C. neoformans,* os produtos gênicos chave desta via são essenciais para a virulência em modelos murinos de infecção. Além disso, foi ainda constatado que a deleção de componentes específicos leva à desregulação da homeostase de cálcio, defeitos de formação capsular e secreção de GXM, menor sobrevivência em macrófagos murinos, sensibilidade a inibidores da calcineurina e a estresse osmótico de retículo endoplasmático (Odom et al., 1997; Liu et al., 2006; Fan et al., 2007; Kmetzsch et al., 2010; Kmetzsch et al., 2013; Chow et al., 2017; Squizani et al., 2018). Além disso, existem muitos genes calcineurina-Crz1 dependentes não caracterizados funcionalmente na cascata de sinalização em *C. neoformans* (Chow et al. 2017). Com relação aos atuais tratamentos para a meningoencefalite criptocócica, existem limitações que destacam a necessidade de desenvolvimento de novas intervenções eficientes que sejam mais acessíveis e com baixa toxicidade (Juvvadi et al., 2017; Rajasingham et al., 2017; Park et al., 2019; Wall & Lopez-Ribot, 2020).

Considerando-se esse cenário, o presente trabalho empregou um fluxo integrado de análises bioinformáticas e experimentais com o objetivo de explorar a complexa cascata de sinalização cálcio-calcineurina em *C. neoformans.* O presente estudo selecionou o gene *CNAG_00522* como um ponto de partida para análise de componentes não canônicos associados com a via de sinalização

cálcio-calcineurina que ainda não foram caracterizados. O resultado associado ao domínio conservado presente na região codificadora deste gene mostrou que, além de possivelmente ser responsivo a sinais de $Ca^{2+}$, também pode estar ligado a formação de vesículas (Lu et al., 2020). A cápsula polissacarídica tem função moduladora imunológica, sendo esse controle relacionado a secreção de um de seus principais componentes, a GXM (Rodrigues et al., 2008, 2007; Zaragoza et al., 2009). Mutantes dos transportadores vacuolares de cálcio Vcx1 e Pmc1 apresentam menor secreção de GXM comparado a linhagens selvagens (Kmetzsch et al., 2010, 2013). Levando em consideração o domínio conservado identificado na região codificadora de *CNAG_00522*, o papel dos polissacarídeos secretados como imunoreguladores, e a potencial conexão da via de estudo com a secreção desse polissacarídeo, é possível que o alvo selecionado possa desempenhar alguma função no processo de secreção que auxilie o patógeno na modulação da resposta imune hospedeira. Entretanto, estudos funcionais complementares ainda são necessários para avaliação do papel de CNAG_00522 na formação e/ou secreção de vesículas contendo GXM. Os dados transcritômicos disponíveis no banco de dados FungiDB sugerem que este gene pode ser importante para a sobrevivência e adaptação de *C. neoformans* no ambiente hospedeiro (Derengowski et al., 2013; Chen et al., 2014; Trevijano-Contador et al., 2018). O alvo selecionado apresentou expressão positivamente regulada em meio de indução de células de gigantes (Trevijano-Contador et al., 2018). Este morfotipo é considerado um determinante de virulência, e confere resistência ao ambiente hospedeiro (Griffiths et al., 2012; Denham & Brown, 2018). *CNAG_00522* também apresentou modulação positiva de expressão em condições de interação com a ameba *Acanthamoeba castellanii,* um predador natural da levedura (Derengowski et al., 2013), bem como em condição *in vivo* no líquido cefalorraquidiano (CSF) de pacientes (Chen et al., 2014). Esses dados reforçam que CNAG_00522 é potencialmente importante para a sobrevivência tanto no hospedeiro quanto no ambiente. A análise de centralidade revelou que *CNAG_00522* é um gene *bottleneck* na rede obtida para as análises do mutante *cna1.* Proteínas *bottleneck* normalmente representam conectores importantes que podem ter um papel essencial em redes biológicas (Yu et al., 2007). Nesse

sentido, é possível que esse gene conecte processos essenciais para a adaptação de *C. neoformans* a diferentes estresses. O ambiente hospedeiro impõe desafios à sobrevivência da levedura através de processos como estresse oxidativo e restrição nutricional (Griffiths et al., 2012). Os resultados das análises de enriquecimento funcional das redes evidenciaram ontologias relacionadas a esses tipos de estresse em relação ao alvo e seus interatores. Além disto, resultados preliminares de RT-qPCR evidenciaram que a expressão de *CNAG_00522* é possivelmente termoregulada, uma vez que os níveis de expressão desse gene são maiores em culturas a 37ºC em comparação a 25ºC. Ainda, os níveis transcricionais de *CNAG_00522* nos mutantes *crz1* são significativamente maiores em relação à linhagem selvagem, o que sugere que Crz1 é um regulador negativo desse gene. Porém, *CNAG_00522* não foi identificado como diferencialmente expresso em nossas análises de expressão diferencial, possivelmente por variações nas condições de cultivo utilizadas. Constatamos ainda que a expressão de CNAG_00522 depende da presença do transportador de cálcio vacuolar Pmc1, validando os resultados obtidos na análise de expressão diferencial.

Ensaios funcionais serão necessários para comprovar a participação de *CNAG_00522* na via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina e virulência de *C. neoformans*.

## 5. Conclusões

- A expressão de CNAG_00522 é modulada pela atividade de *PMC1* e *CNA1;*
- O produto gênico de CNAG_00522 e seus potenciais interatores diretos e indiretos estão relacionados a ontologias de processos basais celulares como estresse oxidativo, metabolismo de carboidratos e produção de energia;
- Crz1 é um regulador negativo da expressão de CNAG_00522, em condições dependentes de temperatura.
- A expressão de CNAG_00522 é positivamente regulada em temperatura fisiológica do hospedeiro humano.
- A potencial região regulatória de CNAG_00522 possui motivos de ligação para os fatores de transcrição Crz1 e Pdr802.

## 6. Perspectivas

Realizar a caracterização funcional completa de CNAG_00522 na via de sinalização cálcio calcineurina em *C. neoformans,* pela execução dos seguintes objetivos:

- Construir uma linhagem *knockout* e complementada para o gene CNAG_00522 em C*. neoformans* H99;
- Avaliar fenótipos de estresse associados com a deleção de CNAG_00522 e a via cálcio-calcineurina;
- Determinar o perfil de expressão de CNAG_00522 em condições de ativação e inibição da via cálcio-calcineurina;
- Verificar o papel de CNAG_00522 na formação de vesículas e células gigantes;
- Avaliar o perfil de virulência das linhagens selvagem e mutantes em modelo de *Galleria mellonella* e murino;
- Propor um mecanismo de ação de CNAG_00522 durante a interação com células hospedeiras por *dual* RNA-seq.

## 7. Referências


Abassi, M., Boulware, D. R., & Rhein, J. (2015). Cryptococcal Meningitis: Diagnosis and Management Update. *Current Tropical Medicine Reports*, *2*(2), 90–99.

Aksenov SI, Babyeva IP, Golubev VI. (1973). On the mechanism of adaptation of micro-organisms to conditions of extreme low humidity. Life Sciences and Space Research.;11:55-61.

Bermas, A., & Geddes-McAlister, J. (2020). Combatting the evolution of antifungal resistance in Cryptococcus neoformans. *Molecular Microbiology*, *114*(5), 721–734. https://doi.org/10.1111/mmi.14565

Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R. O., & Denning, D. W. (2017). Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *Journal of Fungi*, *3*(4). https://doi.org/10.3390/jof3040057

Buchanan, K. L., & Murphy, J. W. (1998). What makes Cryptococcus neoformans a pathogen? *Emerging Infectious Diseases*, *4*(1), 71–83.

Butcher, E.C., Berg, E.L., Kunkel, E.J. (2004). Systems biology in drug discovery. Nat. Biotechnol. 22, 1253–1259. https://doi.org/10.1038/nbt1017

Canteros CE, Rodero L, Rivas MC, Davel G. (1996) A rapid urease test for presumptive identification of Cryptococcus neoformans. Mycopathologia.136(1):21-3. doi: 10.1007/BF00436656. PMID: 9144954.

Chayakulkeeree, M., Johnston, S. A., Oei, J. B., Lev, S., Williamson, P. R., Wilson, C. F., Zuo, X., Leal, A. L., Vainstein, M. H., Meyer, W., Sorrell, T. C., May, R. C., & Djordjevic, J. T. (2011). SEC14 is a specific requirement for secretion of phospholipase B1 and pathogenicity of Cryptococcus neoformans. *Molecular Microbiology*, *80*(4), 1088–1101. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07632.x

Chen, S. C. A., Wright, L. C., Santangelo, R. T., Muller, M., Moran, V. R., Kuchel, P. W., & Sorrell, T. C. (1997). Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by Cryptococcus neoformans. *Infection and Immunity*, *65*(2), 405–411. https://doi.org/10.1128/iai.65.2.405-411.1997

Chen, Y., Toffaletti, D. L., Tenor, J. L., Litvintseva, A. P., Fang, C., Mitchell, T. G., McDonald, T. R., Nielsen, K., Boulware, D. R., Bicanic, T., & Perfect, J. R. (2014). The Cryptococcus neoformans transcriptome at the site of human meningitis. *MBio*, *5*(1), 1–10. https://doi.org/10.1128/mBio.01087-13

Chow, E. W. L., Clancey, S. A., Billmyre, R. B., Averette, A. F., Granek, J. A., Mieczkowski, P., Cardenas, M. E., & Heitman, J. (2017). Elucidation of the calcineurin-Crz1 stress response transcriptional network in the human fungal pathogen Cryptococcus neoformans. *PLoS Genetics*, *13*(4), 1–29. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006667

Cordero, R. J. B., Robert, V., Cardinali, G., Arinze, E. S., Thon, S. M., & Casadevall, A. (2018). Impact of Yeast Pigmentation on Heat Capture and Latitudinal Distribution. *Current Biology*, *28*(16), 2657-2664.e3. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.06.034

Cox, G. M., McDade, H. C., Chen, S. C. A., Tucker, S. C., Gottfredsson, M., Wright, L. C., Sorrell, T. C., Eidich, S. D., Casadevall, A., Ghannoum, M. A., & Perfect, J. R. (2001). Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for Cryptococcus neoformans. *Molecular Microbiology*, *39*(1), 166–175. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02236.x

Cox, G. M., Mukherjee, J., Cole, G. T., Casadevall, A., & Perfect, J. R. (2000). Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infection and Immunity*, *68*(2), 443–448. https://doi.org/10.1128/IAI.68.2.443-448.2000

Cruz, M. C., Del Poeta, M., Wang, P., Wenger, R., Zenke, G., Quesniaux, V. F. J., Movva, N. R., Perfect, J. R., Cardenas, M. E., & Heitman, J. (2000). Immunosuppressive and nonimmunosuppressive cyclosporine analogs are toxic to the opportunistic fungal pathogen Cryptococcus neoformans via cyclophilin-dependent inhibition of calcineurin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *44*(1), 143–149. https://doi.org/10.1128/AAC.44.1.143-149.2000

Cui, J., Kaandorp, J. A., Ositelu, O. O., Beaudry, V., Knight, A., Nanfack, Y. F., & Cunningham, K. W. (2009). Simulating calcium influx and free calcium concentrations in yeast. *Cell Calcium*, *45*(2), 123–132.

Danhof, M., Klein, K., Stolk, P., Aitken, M., Leufkens, H. (2018). The future of drug development: the paradigm shift towards systems therapeutics. Drug Discov. Today 23, 1990–1995. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.09.002

de Melo, A. T., Martho, K. F., Roberto, T. N., Nishiduka, E. S., Machado, J., Brustolini, O. J. B., Tashima, A. K., Vasconcelos, A. T., Vallim, M. A., & Pascon, R. C. (2019). The regulation of the sulfur amino acid biosynthetic pathway in Cryptococcus neoformans: the relationship of Cys3, Calcineurin, and Gpp2 phosphatases. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–19. https://doi.org/10.1038/s41598-019-48433-5

Denham, S. T., & Brown, J. C. S. (2018). Mechanisms of pulmonary escape and dissemination by cryptococcus neoformans. *Journal of Fungi*, *4*(1). https://doi.org/10.3390/jof4010025

Derengowski, L. da S., Paes, H. C., Albuquerque, P., Tavares, A. H. F. P., Fernandes, L., Silva-Pereira, I., & Casadevall, A. (2013). The transcriptional response of cryptococcus neoformans to ingestion by Acanthamoeba castellanii and macrophages provides insights into the evolutionary adaptation to the mammalian host. *Eukaryotic Cell*, *12*(5), 761–774. https://doi.org/10.1128/EC.00073-13

Djordjevic, J. T. (2010). Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from Cryptococcus neoformans. *Frontiers in Microbiology*, *1*(NOV), 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00125

Evans, R. J., Li, Z., Hughes, W. S., Djordjevic, J. T., Nielsen, K., & May, R. C. (2015). Cryptococcal phospholipase B1 is required for intracellular proliferation and control of titan cell morphology during macrophage infection. *Infection and Immunity*, *83*(4), 1296–1304. https://doi.org/10.1128/IAI.03104-14

Fan, W., Idnurm, A., Breger, J., Mylonakis, E., & Heitman, J. (2007). Eca1, a sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase, is involved in stress tolerance and virulence in Cryptococcus neoformans. *Infection and Immunity*, *75*(7), 3394–3405. https://doi.org/10.1128/IAI.01977-06

Fox, D. S., Cruz, M. C., Sia, R. A. L., Ke, H., Cox, G. M., Cardenas, M. E., & Heitman, J. (2001). Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in Cryptococcus neoformans. *Molecular Microbiology*, *39*(4), 835–849. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02295.x

Fu, M. S., Coelho, C., De Leon-Rodriguez, C. M., Rossi, D. C. P., Camacho, E., Jung, E. H., Kulkarni, M., & Casadevall, A. (2018). Cryptococcus neoformans urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. In *PLoS Pathogens* (Vol. 14, Issue 6). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007144

Ganendren, R., Carter, E., Sorrell, T., Widmer, F., & Wright, L. (2006). Phospholipase B activity enhances adhesion of Cryptococcus neoformans to a human lung epithelial cell line. *Microbes and Infection*, *8*(4), 1006–1015. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.10.018

García-Rodas, R., & Zaragoza, O. (2012). Catch me if you can: Phagocytosis and killing avoidance by Cryptococcus neoformans. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *64*(2), 147–161. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00871.x

Griffiths, E. J., Kretschmer, M., & Kronstad, J. W. (2012). Aimless mutants of Cryptococcus neoformans: Failure to disseminate. *Fungal Biology Reviews*, *26*(2–3), 61–72. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.02.004

Ikeda, R., Sugita, T., Jacobson, E. S., & Shinoda, T. (2003). Effects of melanin upon susceptibility of Cryptococcus to antifungals. *Microbiology and Immunology*, *47*(4), 271–277. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03395.x

Johnston, S. A., & May, R. C. (2013). Cryptococcus interactions with macrophages: Evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. *Cellular Microbiology*, *15*(3), 403–411. https://doi.org/10.1111/cmi.12067

Juvvadi, P. R., Lee, S. C., Heitman, J., & Steinbach, W. J. (2017). Calcineurin in fungal virulence and drug resistance: Prospects for harnessing targeted inhibition of calcineurin for an antifungal therapeutic approach. *Virulence*, *8*(2), 186–197. https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1201250

Kechichian, T. B., Shea, J., & Del Poeta, M. (2007). Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient

mutant of Cryptococcus neoformans in immunodeficient mice. *Infection and Immunity*, *75*(10), 4792–4798. https://doi.org/10.1128/IAI.00587-07

Kell, D. B. (2013). Finding novel pharmaceuticals in the systems biology era using multiple effective drug targets, phenotypic screening and knowledge of transporters: Where drug discovery went wrong and how to fix it. *FEBS Journal*, *280*(23), 5957–5980. https://doi.org/10.1111/febs.12268

Kmetzsch, Livia, Staats, C. C., Cupertino, J. B., Fonseca, F. L., Rodrigues, M. L., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2013). The calcium transporter Pmc1 provides Ca2+ tolerance and influences the progression of murine cryptococcal infection. *FEBS Journal*, *280*(19), 4853–4864. https://doi.org/10.1111/febs.12458

Kmetzsch, Lívia, Staats, C. C., Simon, E., Fonseca, F. L., de Oliveira, D. L., Sobrino, L., Rodrigues, J., Leal, A. L., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010). The vacuolar Ca2+ exchanger vcx1 is involved in calcineurin-dependent Ca2+ tolerance and virulence in Cryptococcus neoformans. *Eukaryotic Cell*, *9*(11), 1798–1805. https://doi.org/10.1128/EC.00114-10

Kozel, T. R., & Mastroianni, R. P. (1976). Inhibition of phagocytosis by cryptococcal polysaccharide: dissociation of the attachment and ingestion phases of phagocytosis. *Infection and Immunity*, *14*(1), 62–67.

Kozel TR, Gotschlich EC. (1982) The capsule of cryptococcus neoformans passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. J Immunol. Oct;129(4):1675-80. PMID: 7050244.

Kozubowski, L., Lee, S. C., & Heitman, J. (2009). Signalling pathways in the pathogenesis of Cryptococcus. *Cellular Microbiology*, *11*(3), 370–380. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01273.x

Kraus, P. R., Boily, M. J., Giles, S. S., Stajich, J. E., Allen, A., Cox, G. M., Dietrich, F. S., Perfect, J. R., & Heitman, J. (2004). Identification of Cryptococcus neoformans temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. *Eukaryotic Cell*, *3*(5), 1249–1260. https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1249-1260.2004

Kraus, P. R., Nichols, C. B., & Heitman, J. (2005). Calcium- and calcineurin-independent roles for calmodulin in Cryptococcus neoformans morphogenesis and high-temperature growth. *Eukaryotic Cell*, *4*(6), 1079–1087. https://doi.org/10.1128/EC.4.6.1079-1087.2005

Kwon-chung, K. J., Fraser, J. A., Doering, T. L., Wang, Z. A., Janbon, G., Idnurm, A., & Bahn, Y. (2014). Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harbor Prespectives in Medicine*, *4*, a019760.

Kwon-Chung, K. J., Polacheck, I., & Popkin, T. J. (1982). Melanin-lacking mutants of Cryptococcus neoformans and their virulence for mice. *Journal of Bacteriology*, *150*(3), 1414–1421. https://doi.org/10.1128/jb.150.3.1414-1421.1982

Kwon-Chung, Kyung J., Bennett, J. E., Wickes, B. L., Meyer, W., Cuomo, C. A., Wollenburg, K. R., Bicanic, T. A., Castañeda, E., Chang, Y. C., Chen, J., Cogliati, M., Dromer, F., Ellis, D., Filler, S. G., Fisher, M. C., Harrison, T. S., Holland, S. M., Kohno, S., Kronstad, J. W., … Casadevall, A. (2017). The Case for Adopting the "Species Complex" Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *MSphere*, *2*(1), 1–7. https://doi.org/10.1128/msphere.00357-16

Lev, S., Desmarini, D., Chayakulkeeree, M., Sorrell, T. C., & Djordjevic, J. T. (2012). The Crz1/Sp1 Transcription Factor of Cryptococcus neoformans Is Activated by Calcineurin and Regulates Cell Wall Integrity. *PLoS ONE*, *7*(12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051403

Lin, X., & Heitman, J. (2006). The biology of the Cryptococcus neoformans species complex. *Annual Review of Microbiology*, *60*, 69–105. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142102

Liu, L., Tewari, R. P., & Williamson, P. R. (1999). Laccase protects Cryptococcus neoformans from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infection and Immunity*, *67*(11), 6034–6039. https://doi.org/10.1128/iai.67.11.6034-6039.1999

Liu, M., Du, P., Heinrich, G., Cox, G. M., & Gelli, A. (2006). Cch1 mediates calcium entry in Cryptococcus neoformans and is essential in low-calcium environments. *Eukaryotic Cell*, *5*(10), 1788–1796. https://doi.org/10.1128/EC.00158-06

Liu, S., Hou, Y., Liu, W., Lu, C., Wang, W., & Sun, S. (2015). Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. *Eukaryotic Cell*, *14*(4), 324–334. https://doi.org/10.1128/EC.00271-14

Liu, T. B., Perlin, D. S., & Xue, C. (2012). Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. *Virulence*, *3*(2), 173–181. https://doi.org/10.4161/viru.18685

Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C. J., & Marchler-Bauer, A. (2020). CDD/SPARCLE: The conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D265–D268. https://doi.org/10.1093/nar/gkz991

Maggiora, G. M. (2011). The reductionist paradox: Are the laws of chemistry and physics sufficient for the discovery of new drugs? *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *25*(8), 699–708. https://doi.org/10.1007/s10822-011-9447-8

Martinez-Mayorga, K., Madariaga-Mazon, A., Medina-Franco, J. L., & Maggiora, G. (2020). The impact of chemoinformatics on drug discovery in the pharmaceutical industry. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *15*(3), 293–306. https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1696307

Maruvada, R., Zhu, L., Pearce, D., Zheng, Y., Perfect, J., Kwon-Chung, K. J., & Kim, K. S. (2012). Cryptococcus neoformans phospholipase B1 activates host

cell Rac1 for traversal across the blood-brain barrier. *Cellular Microbiology*, *14*(10), 1544–1553. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01819.x

May, R. C., Stone, N. R. H., Wiesner, D. L., Bicanic, T., & Nielsen, K. (2016). Cryptococcus: From environmental saprophyte to global pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(2), 106–117. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6

Mednick, A. J., Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2005). Melanization of Cryptococcus neoformans affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. *Infection and Immunity*, *73*(4), 2012–2019.

Mitchell T, Castañeda E, Nielsen K, Wanke B, Lazéra M. (2011). Environmental Niches for Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii, p 237-259. *In* Heitman J, Kozel T, Kwon-Chung K, Perfect J, Casadevall A (ed), *Cryptococcus*. ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/9781555816858.ch18

Molloy, S. F., Chiller, T., Greene, G. S., Burry, J., Govender, N. P., Kanyama, C., Mfinanga, S., Lesikari, S., Mapoure, Y. N., Kouanfack, C., Sini, V., Temfack, E., Boulware, D. R., Dromer, F., Denning, D. W., Day, J., Stone, N. R. H., Bicanic, T., Jarvis, J. N., … Loyse, A. (2017). Cryptococcal meningitis: A neglected NTD? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(6), 1–7. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005575

Nurudeen, T. A., & Ahearn, D. G. (1979). Regulation of melanin production by Cryptococcus neoformans. *Journal of Clinical Microbiology*, *10*(5), 724–729. https://doi.org/10.1128/jcm.10.5.724-729.1979

Odom, A., Del Poeta, M., Perfect, J., & Heitman, J. (1997). The immunosuppressant FK506 and its nonimmunosuppressive analog L- 685,818 are toxic to Cryptococcus neoformans by inhibition of a common target protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *41*(1), 156–161. https://doi.org/10.1128/aac.41.1.156

Odom, Audrey, Muir, S., Lim, E., Toffaletti, D. L., Perfect, J., & Heitman, J. (1997). Calcineurin is required for virulence of Cryptococcos neoformans. *EMBO Journal*, *16*(10), 2576–2589. https://doi.org/10.1093/emboj/16.10.2576

Olszewski, M. A., Noverr, M. C., Chen, G. H., Toews, G. B., Cox, G. M., Perfect, J. R., & Huffnagle, G. B. (2004). Urease Expression by Cryptococcus neoformans Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. *American Journal of Pathology*, *164*(5), 1761–1771. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63734-0

Park, H. S., Chow, E. W. L., Fu, C., Soderblom, E. J., Moseley, M. A., Heitman, J., & Cardenas, M. E. (2016). Calcineurin Targets Involved in Stress Survival and Fungal Virulence. *PLoS Pathogens*, *12*(9), 1–28. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005873

Park, H. S., Lee, S. C., Cardenas, M. E., & Heitman, J. (2019). Calcium-Calmodulin-Calcineurin Signaling: A Globally Conserved Virulence Cascade in Eukaryotic Microbial Pathogens. *Cell Host and Microbe*, *26*(4), 453–462. https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.08.004

Pinu, F. R., Beale, D. J., Paten, A. M., Kouremenos, K., Swarup, S., Schirra, H. J., & Wishart, D. (2019). Systems biology and multi-omics integration: Viewpoints from the metabolomics research community. *Metabolites*, *9*(4), 1–31. https://doi.org/10.3390/metabo9040076

Pukkila-Worley, R., Gerrald, Q. D., Kraus, P. R., Boily, M. J., Davis, M. J., Giles, S. S., Cox, G. M., Heitman, J., & Alspaugh, J. A. (2005). Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the Cryptococcus neoformans cyclic AMP cascade. *Eukaryotic Cell*, *4*(1), 190–201. https://doi.org/10.1128/EC.4.1.190-201.2005

Rajasingham, R., Smith, R. M., Park, B. J., Jarvis, J. N., Govender, N. P., Chiller, T. M., Denning, D. W., Loyse, A., & Boulware, D. R. (2017). Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, *17*(8), 873–881. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8

Rodrigues, M. L., & Albuquerque, P. C. (2018). Searching for a change: The need for increased support for public health and research on fungal diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *12*(6), 1–5.

Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., Oliveira, D.L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J.D., Almeida, I.C., Casadevall, A., 2008. Extracellular vesicles produced by Cryptococcus neoformans contain protein components associated with virulence. Eukaryot. Cell 7, 58–67. https://doi.org/10.1128/EC.00370-07

Rodrigues, M.L., Nimrichter, L., Oliveira, D.L., Frases, S., Miranda, K., Zaragoza, O., Alvarez, M., Nakouzi, A., Feldmesser, M., Casadevall, A., 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. https://doi.org/10.1128/EC.00318-06

Rosa e Silva, L. K., Staats, C. C., Goulart, L. S., Morello, L. G., Pelegrinelli Fungaro, M. H., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2008). Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen Cryptococcus neoformans using representational difference analysis. *Research in Microbiology*, *159*(3), 221–229. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.006

Rosas, Á. L., & Casadevall, A. (1997). Melanization affects susceptibility of Cryptococcus neoformans to heat and cold. *FEMS Microbiology Letters*, *153*(2), 265–272. https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00239-5

Roy, A., Kumar, A., Baruah, D., & Tamuli, R. (2020). Calcium signaling is involved in diverse cellular processes in fungi. *Mycology*, *00*(00), 1–15.

Salas, S. D., Bennett, J. E., Kwon-Chung, K. J., Perfect, J. R., & Williamson, P. R. (1996). Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of Cryptococcus neoformans. *The Journal of experimental medicine*, *184*(2), 377–386. https://doi.org/10.1084/jem.184.2.377

Shi, M., Li, S. S., Zheng, C., Jones, G. J., Kim, K. S., Zhou, H., Kubes, P., & Mody, C. H. (2010). Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of Cryptococcus neoformans in mouse brain. *Journal of Clinical Investigation*, *120*(5), 1683–1693. https://doi.org/10.1172/JCI41963

Sloan, D. J., & Parris, V. (2014). Cryptococcal meningitis: Epidemiology and therapeutic options. *Clinical Epidemiology*, *6*(1), 169–182. https://doi.org/10.2147/CLEP.S38850

Soares, E. A., Lazera, M. dos S., Wanke, B., Faria Ferreira, M. de, Carvalhaes de Oliveira, R. V., Oliveira, A. G., & Coutinho, Z. F. (2019). Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012 A descriptive epidemiological study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(7), 1–17. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007569

Squizani, E. D., Oliveira, N. K., Reuwsaat, J. C. V., Marques, B. M., Lopes, W., Gerber, A. L., de Vasconcelos, A. T. R., Lev, S., Djordjevic, J. T., Schrank, A., Vainstein, M. H., Staats, C. C., & Kmetzsch, L. (2018). Cryptococcal dissemination to the central nervous system requires the vacuolar calcium transporter Pmc1. *Cellular Microbiology*, *20*(2), 1–13. https://doi.org/10.1111/cmi.12803

Stempinski, P. R., Zielinski, J. M., Dbouk, N. H., Huey, E. S., McCormack, E. C., Rubin, A. M., Chandrasekaran, S., & Kozubowski, L. (2020). Genetic contribution to high temperature tolerance in Cryptococcus neoformans. *Oxford University Press*.

Taylor-Smith, L. M., & May, R. C. (2016). New weapons in the Cryptococcus infection toolkit. *Current Opinion in Microbiology*, *34*(Figure 1), 67–74. https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.018

Trevijano-Contador, N., de Oliveira, H. C., García-Rodas, R., Rossi, S. A., Llorente, I., Zaballos, Á., Janbon, G., Ariño, J., & Zaragoza, Ó. (2018). Cryptococcus neoformans can form titan-like cells in vitro in response to multiple signals. In *PLoS Pathogens* (Vol. 14, Issue 5). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007007

van Duin, D., Casadevall, A., & Nosanchuk, J. D. (2002). Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(11), 3394–3400. https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3394

Wall, G., & Lopez-Ribot, J. L. (2020). Current antimycotics, new prospects, and future approaches to antifungal therapy. *Antibiotics*, *9*(8), 1–10. https://doi.org/10.3390/antibiotics9080445

Wang, Y., & Casadevall, A. (1994). Decreased Susceptibility of Melanized Cryptococcus neoformans to UV Light. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, *60*(10), 3864–3866.

Yu, H., Kim, P. M., Sprecher, E., Trifonov, V., & Gerstein, M. (2007). The importance of bottlenecks in protein networks: Correlation with gene essentiality and expression dynamics. *PLoS Computational Biology*, *3*(4), 713–720. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030059

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

Zaragoza, O., Chrisman, C. J., Castelli, M. V., Frases, S., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J. L., & Casadevall, A. (2008). Capsule enlargement in Cryptococcus neoformans confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cellular Microbiology*, *10*(10), 2043–2057.

Zaragoza O, Nielsen K. (2013). Titan cells in Cryptococcus neoformans: cells with a giant impact. Curr Opin Microbiol. Aug;16(4):409-13. doi: 10.1016/j.mib.2013.03.006.

Zaragoza, O., Rodrigues, M. L., De Jesus, M., Frases, S., Dadachova, E., & Casadevall, A. (2009). Chapter 4 The Capsule of the Fungal Pathogen Cryptococcus neoformans. In *Advances in Applied Microbiology* (1st ed., Vol. 68, Issue 09). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)01204-0

Zavala, S., & Baddley, J. W. (2020). Cryptococcosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, *41*, 69–79.

Zimmer, B. L., & Roberts, G. D. (1979). Rapid selective urease test for presumptive identification of Cryptococcus neoformans. *Journal of Clinical Microbiology*, *10*(3), 380–381. https://doi.org/10.1128/jcm.10.3.380-381.1979