



CATÓLICA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

USO DA FERRAMENTA COMPUTACIONAL ALPHAFOLD PARA ESTUDO DO
POTENCIAL DAS LISINAS DESACETILASES DE FUNGOS PATOGÊNICOS COMO
ALVOS DE DROGAS

Jéssica Fernanda Gasparino Diaz

Outubro de 2022



CATÓLICA

ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

USO DA FERRAMENTA COMPUTACIONAL ALPHAFOLD PARA ESTUDO DO POTENCIAL DAS LISINAS DESACETILASES DE FUNGOS PATOGÊNICOS COMO ALVOS DE DROGAS

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica
Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Aplicada

Jéssica Fernanda Gasparino Diaz

Orientador: Doutor Nilmar Silvio Moretti (Universidade Federal de São Paulo);

Coorientador: Doutor Antoniel Augusto Severo Gomes
(Universidade Federal Riode Janeiro);

Tutora: Doutora Célia Manaia (Universidade Católica Portuguesa).

Outubro de 2022

Resumo

As infecções causadas por fungos tem sido grande problema para a saúde pública e para a economia. Os tratamentos disponíveis para essas infecções são limitados e frequentemente o aparecimento de fungos resistentes é noticiado. Neste sentido, se faz necessário a identificação de novos alvos que possam ser explorados para o desenvolvimento de novos tratamentos. Nos últimos anos, avanços tecnológicos e de inteligência artificial surgiram e diversas ferramentas que permitem o estudo de estruturas proteicas que podem ser utilizadas para etapas de pré-validação de alvos de drogas. Entre essas ferramentas, esta o Alphafold, que possibilita análises de diversas proteínas, gerando modelos tridimensionais preditos. Neste projeto, focamos no estudo das lisinas desacetilases (KDACs) de duas espécies de fungos de grande importância médica, *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, com intuito de iniciar a validação dessas enzimas como alvos de drogas. Assim, obtivemos as sequências de todas as KDACs de *C. albicans* e *A. fumigatus* usando o banco de dados Uniprot, que foram submetidas ao AlphaFold para obtenção dos modelos tridimensionais preditos de cada enzima. Como modelo comparativo em nossas análises utilizamos KDACs de *Saccharomyces cerevisiae* e humanas. Conseguimos obter todos os modelos tridimensionais das KDACs de interesse que foram então utilizados em análises estruturais para determinar as regiões importantes do sítio ativo que caracterizam as lisinas desacetilases e verificamos que todas as KDACs de *C. albicans* e *A. fumigatus* possuem essas características. Após a caracterização estrutural inicial das KDACs de fungos, realizamos diversas análises comparativas com as enzimas de humanos, para averiguar o potencial delas como alvos de drogas. Verificamos diferenças estruturais marcantes com as proteínas humanas, um dos principais fatores que permite explorar uma determinada proteína como alvo para o desenvolvimento de inibidores específicos. Finalmente, realizamos análises de docking molecular utilizando o inibidor clássico de KDACs, Tricostatina A (TSA), e CaHos3, CaHda1 e AfHdaB, e verificamos que o inibidor é capaz de interagir na região do sítio ativo de CaHos3 e CaHda1. Em conclusão, confirmamos a robustez da ferramenta AlphaFold para análises estruturais e obtivemos dados que indicam a possibilidade de utilizar as KDACs de *C. albicans* e *A. fumigatus* em estudos futuros para identificação de inibidores específicos que poderiam ser utilizados no tratamento das doenças causadas por esses fungos.

Palavras-chaves: Lisinas desacetilases; *C. albicans*; *A. fumigatus*; Alphafold; Modelagem tridimensional; Alvos de drogas.

Abstract

Fungal infections have been a major problem for public health and the economy. In addition, the treatments available for these infections are limited and the emergence of resistant fungi is frequently reported. In this sense, it is necessary to identify new targets that can be explored for the development of new treatments. In recent years, with technological advances and artificial intelligence, several tools have emerged to the study of protein structures, which could be explored for pre-validation of specific proteins as drug targets. Among these tools, the AlphaFold, which allows analysis of various proteins, generating three-dimensional models. In this project we focused on the study of lysine deacetylases (KDACs) of two fungal species of global health importance, *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*, in order to validate these enzymes as possible drug targets. Thus, we initially obtained the sequences of all KDACs from *C. albicans* and *A. fumigatus* using the Uniprot database, which were submitted to AlphaFold to obtain the predicted 3D models of each enzyme. As a comparative model in our analyzes we used *Saccharomyces cerevisiae* and human KDACs. We were able to obtain all 3D protein models of the KDACs of interest that were then used in structural analyzes to determine the important regions of the active site that characterize lysine deacetylases. We found that all KDACs from *C. albicans* and *A. fumigatus* have these characteristics. After the initial structural characterization of fungal KDACs, we performed several comparative analyzes with human enzymes, to ascertain their potential as drug targets. Important structural differences with human proteins is one of the main factors that allows exploring a particular protein as a target for the development of specific inhibitors. Finally, we performed molecular docking analyzes using the classic inhibitor of KDACs, Trichostatin A (TSA), and CaHos3, CaHda1 and AfHdaB, and verified that the inhibitor can interact in the active site region of CaHos3 and CaHda1. In conclusion, we confirmed the robustness of the AlphaFold tool for structural analysis studies and obtained data that indicate the possibility of using KDACs from *C. albicans* and

A. fumigatus in future studies to identify specific inhibitors and further be used in the treatment of diseases caused by these fungi.

Keywords: Lysine deacetylases; *C. albicans*; *A. fumigatus*; AlphaFold; Three-dimensional modeling; Drug targets.

Agradecimentos

Primeiramente, desejo expressar minha eterna gratidão aos meus orientadores Professor Dr. Nilmar Silvio Moretti e o Professor Dr. Antoniel Augusto Severo Gomes, por todo suporte e a excelente orientação que deram para que possa realizar este projeto, compartilhando seu conhecimento, solucionando dúvidas que foram surgindo durante este trabalho e sempre empenhados em ajudar em todo processo de construção dessa tese.

Agradeço a Universidade Católica Portuguesa do Porto por ter me recebido e me dado assistência nos momentos que precisei, e a todos os docentes pela dedicação em transmitir seus conhecimentos durante as aulas. E também a todos os meus colegas do mestrado de Microbiologia Aplicada, pelo apoio e amizade que me proporcionaram durante ano letivo.

Por final, quero agradecer minha família e amigos, por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos, mesmo que à distância.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza dos seus sonhos.”

– Eleanor Roosevelt.

Índice

| | |
|---|-----------|
| Resumo | 2 |
| Abstract | 3 |
| Agradecimentos | 4 |
| 1. Introdução | 6 |
| 1.1. Infecções fúngicas e fungos de importância médica | 7 |
| 1.2. <i>Aspergillus fumigatus</i> | 7 |
| 1.3. <i>Candida albicans</i> | 9 |
| 1.4. Acetilação de proteínas em fungos | 10 |
| 1.5. Regulação dos níveis de acetilação proteica | 11 |
| 1.6. Lisinas desacetilases (KDACs) | 11 |
| 1.7. Maquinaria de regulação da acetilação proteica em fungos | 12 |
| 1.8. KDACs como inibidores de fungos | 13 |
| 1.9. Ferramentas computacionais no estudo estrutural e funcional de proteínas | 14 |
| 1.10. Objetivos | 15 |
| 2. Materiais e Métodos | 16 |
| 3. Resultados | 18 |
| 3.1. Identificação das KDACs de <i>C. albicans</i> e <i>A. fumigatus</i> | 18 |
| 3.2. Identidade de sequência das KDACs de <i>C. albicans</i> e <i>A. fumigatus</i> | 19 |
| 3.3. Análise filogenética das KDACs classe I e II de <i>C. albicans</i> e <i>A. fumigatus</i> | 20 |
| 3.4. Obtenção das estruturas preditas das KDACs classe I e II de <i>C. albicans</i> e <i>A. fumigatus</i> | 22 |
| 3.4.1. Análise estrutural do sítio catalítico das KDACs classe I de <i>C. albicans</i> e <i>A. fumigatus</i> | 22 |
| 3.4.2. Análise estrutural do sítio catalítico das KDACs classe II de <i>C. albicans</i> e <i>A. fumigatus</i> | 29 |
| 3.4.3. KDACs de <i>C. albicans</i> e <i>A. fumigatus</i> como potenciais alvos de drogas | 33 |
| 4. Discussão | 36 |
| 5. Conclusões Gerais | 39 |
| 6. Trabalho Futuro | 40 |
| 7. Referências Bibliográficas | 41 |

1. Introdução

Os fungos são espécies pertencentes ao reino Fungi e são considerados quimioheterotróficos, ou seja, organismos que usam matéria orgânica como fonte de energia e de carbono, e adquirem alimentos através da absorção desse material. Os fungos se dividem em dois grupos, leveduras e bolores, onde as leveduras crescem na forma de células únicas se reproduzindo através de brotamento, enquanto os bolores desenvolvem-se como hifas, que são filamentos longos classificados em hifas septadas, que são células individualizadas contendo um único núcleo; e hifas não septadas ou cenocíticas, que são multinucleadas. O agrupamento das hifas dá origem ao micélio, que tem sua parte vegetativa desempenhando funções de assimilação, fixação e crescimento do fungo, e a parte aérea, que cresce acima do substrato e tem função reprodutiva (Oliveira, 2014).

Existem mais de 100.000 espécies de fungos descritas, entre as quais temos aquelas que trazem algum benefício ao homem e outras que são causadoras de doenças tanto no homem como em animais. Do ponto de vista de benefícios, eles são importantes na cadeia alimentar por atuarem na decomposição da matéria vegetal morta, promovendo a reciclagem das partes duras das plantas na qual os animais não conseguem digerir, graças as suas enzimas extracelulares. Outra atividade importante, é a simbiose dos fungos com as plantas, que auxiliam estas na obtenção de minerais e água do solo. Finalmente, é importante destacar a importância econômica dos fungos, tanto como fontes de alimento, como seu uso na indústria para produção de pães, queijos, iogurtes, e na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos, como para a produção da penicilina (Tortora et al.,2017)

Do ponto de vista de agentes infecciosos, atualmente existem cerca de 200 espécies de fungos patogênicos para os seres humanos e animais. Estudos têm demonstrado que ao longo dos últimos dez anos a incidência de infecções fúngicas tem crescido consideravelmente, afetando principalmente unidades de cuidados intensivos, sendo os pacientes mais prejudicados os imunocomprometidos. Além do mais, o mercado da agroindústria tem sido extremamente atingido por fungos que causam perdas nas plantações, acarretando prejuízos econômicos de bilhões de dólares por ano (Tortora et al.,2017).

1.1. Infecções fúngicas e fungos de importância médica

As infecções fúngicas tem tido constante aumento nos últimos anos, sendo grande problema para a saúde pública, afetando principalmente grupos de pacientes de alto risco. Como por exemplo, pacientes infectados pelo HIV, pacientes com AIDS, transplantados, imunosuprimidos que fazem tratamento com quimioterápicos, doentes crônicos e pacientes que sofrem distúrbios hematológicos (Góralaska et al.,2018).

A transmissão dos fungos ocorre através dos esporos, que são utilizados para reprodução desses organismos e normalmente são espalhados no ar e no solo. Tais fungos penetram no organismo na forma de pequenos propágulos dispersos no ar, e nas formas de esporangiósporos ou conídios, na qual são produzidos através de células hifas (Köhler et al.,2014).

Essas infecções fúngicas são chamadas de Micoses e podemos classificá-las em cinco grupos conforme o nível de invasão tecidual no hospedeiro em: sistêmicas, subcutâneas, cutâneas, superficiais e oportunistas (Tortora et al.,2017). As micoses sistêmicas são infecções profundas que podem atingir órgãos e tecidos, e que normalmente tem início a partir de esporos presentes nos pulmões adquiridos pela inalação. Já as micoses subcutâneas, são causadas por fungos saprófitos que irão causar infecções abaixo da pele, como por exemplo, a esporotricose, causada pelo fungo *Sporothrix*, e que afeta principalmente agricultores (Tortora et al.,2017). Já as micoses cutâneas, também chamadas de dermatomicoses, são causadas por fungos que infectam a epiderme, podendo também atingir os cabelos e as unhas. Essa infecção é transmissível entre indivíduos por contato direto ou contato com fios de cabelos e células epidérmicas contaminadas (Tortora et al.,2017). Por último, os fungos oportunistas no seu habitat natural são considerados inofensivos, porém podem tornar-se patogênicos em indivíduos imunossuprimidos. Um exemplo de fungo oportunista é o *Pneumocystis, que causa infecções pulmonares* e era uma das principais causas de pneumonia em pacientes HIV+ antes da introdução do tratamento com trimetoprim-sulfametoxazol (TMX-SMX) (Limper et al.,2017). Entre as infecções fúngicas oportunistas mais comuns temos a Aspergilose e a Candidíase, causadas por espécies de *Aspergillus* e *Candida albicans*, respectivamente (Góralaska et al.,2018). Abaixo, vamos descrever melhor sobre estas espécies.

1.2. Aspergillus fumigatus

As espécies do gênero *Aspergillus* são fungos oportunistas que fazem parte do filo Ascomycota, se caracterizam por serem fungos filamentosos, sua reprodução se dá através de esporos assexuais que se chamam de conídios e são produtores de micotoxinas e metabólitos

(Francisco, 2017). Eles são fungos saprotróficos e estão localizados no solo e na vegetação em decomposição, atuam na reciclagem de carbono e nitrogênio (Veerdonk et al. 2017). Existem mais de 250 espécies de *Aspergillus* spp., das quais por volta de 40 espécies podem causar infecções em humanos, sendo as mais comuns *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* (Góralaska et al.,2018).

Dependendo do status imunológico do indivíduo, o quadro clínico gerado pela infecção por *A. fumigatus* pode variar entre diferentes desordens respiratórias. Em pacientes saudáveis, o sistema imunológico é capaz de eliminar rapidamente os esporos inalados das vias aéreas. No entanto, em pacientes imunocomprometidos ou com algum defeito imunológico como neutropenia, asma ou doença pulmonar com cavitação, os esporos de *A. fumigatus* podem colonizar as vias aéreas e levar ao desenvolvimento da aspergilose; em quadros mais graves causar aspergilose invasiva (AI), que pode levar à morte do paciente. No caso de pacientes asmáticos, o aumento da carga de *A. fumigatus* na via respiratória está associada ao desenvolvimento de aspergilose broncopulmonar alérgica, doença que reduz a qualidade de vida de mais de 5 milhões de pessoas em todo o mundo (Nest et al., 2021; Latgé e Chamilos, 2019). De acordo com o Global Action Fund for Fungal Infections, mundialmente em 2016 houve mais de 250 mil casos de aspergilose invasiva sendo estimadas mais de 125 mil mortes, e aproximadamente 3 milhões de casos de aspergilose pulmonar crônica.

A principal classe de medicamentos utilizados para o tratamento de aspergiloses é a dos azóis, tendo como alvo o ergosterol, componente essencial da membrana celular dos fungos. Os azóis inibem a biossíntese de ergosterol interferindo na integridade da membrana celular. Azóis como o itraconazol são utilizados principalmente para o tratamento de aspergilose pulmonar crônica, enquanto o voriconazol é usado como primeira linha de tratamento para aspergilose invasiva (Denning et al., 2016). Outros dois azóis, isavuconazol e posaconazol, são recomendados para o tratamento de aspergilose invasiva e para pacientes de alto risco, respectivamente (Maertens et al., 2016; Liss et al., 2015). No entanto, apesar destes fármacos serem ainda a melhor via de tratamento contra aspergilose, há a problemática quanto à resistência à azóis que os *Aspergillus* spp. adquirem ao longo do tratamento, principalmente o *Aspergillus fumigatus*.

O mecanismo de resistência observado em *A. fumigatus* é devido principalmente ao resultado de mutações no gene da 14- α sterol demethylase (cyp51A), principal alvo dos azóis. Mutações em determinados códons são observadas, como nas posições G54, M220 e G138 da proteína que induzem mudança nos canais de substrato fazendo com que o azol se ligue a uma

molécula heme e não mais ao lanosterol 14 α -desmetilase que é essencial na biossíntese do ergosterol, permitindo a formação da membrana celular do fungo. Muitas dessas mutações resultam na resistência a quase todos os triazóis anti-*Aspergillus* (Garcia et al., 2018).

1.3. *Candida albicans*

As espécies do gênero *Candida* são fungos pertencentes a microbiota humana, que habitam o trato gastrointestinal e geniturinário, e a pele de seres humanos saudáveis. São fungos comensais, podendo causar pouco ou nenhum dano ao hospedeiro. Contudo, ao afetar o equilíbrio normal da microbiota ou quando o sistema imune está debilitado, pode acarretar danos ao hospedeiro, podendo levar a infecções oportunistas, como candidíase (Vila et al., 2017).

Candida albicans é espécie responsável pela candidíase. No homem, existem diversos tipos de candidíase: mucocutânea, pseudomembranosa e vulvovaginal. A candidíase mucocutânea é a mais comumente encontrada no homem, acometendo áreas úmidas do corpo como os espaços interdigitais, regiões das mamas, axilas, as pregas das virilhas, debaixo de unhas, além da cavidade oral e vaginal (Vieira et al., 2014). A candidíase pseudomembranosa, ou candidíase oral, é caracterizada por placas brancas, macias e ligeiramente elevadas localizadas na língua e na mucosa bucal. Morfologicamente são um emaranhado de hifas fúngicas com epitélio descamado misturado, detritos necróticos, queratina, leucócitos, fibrina e bactérias (RAN et al., 2022). Já a candidíase vulvovaginal é caracterizada pela presença de coceira vaginal, queimação, dor e vermelhidão, seguido de corrimento vaginal (Willems et al., 2020). As lesões podem espalhar-se para o períneo, região perianal e inguinal (Vieira et al., 2014). Em mulheres grávidas, a candidíase vulvovaginal aumenta o risco de complicações na gravidez, como por exemplo, trabalho de parto prematuro, corioamnionite e candidíase cutânea congênita (Ghaddar et al., 2020).

A candidíase pode também evoluir para a sua forma invasiva, onde a infecção se dissemina para outras partes do corpo, como válvulas cardíacas, cérebro, baço, rins e olhos. Essa forma é comum em pessoas com sistema imunológico debilitado e em pessoas hospitalizadas. Nestes casos, a taxa de mortalidade pode atingir níveis entre 40 e 60% (Kullberg et al., 2015; Li et al., 2018).

O tratamento para todos os tipos de candidíase consiste no uso de antifúngicos como equinocandina (caspofungina, micafungina ou anidulafungina), fluconazol, anfotericina B (Pappas et al., 2016).

1.4. Acetilação de proteínas em fungos

Muitos processos celulares estão envolvidos na regulação da virulência de fungos patogênicos e em sua relação com o hospedeiro (Retanal et al., 2021), como por exemplo, alterações morfogênicas, metabólicas e de adaptação térmica ao corpo humano, além da produção de metabólitos com papéis importantes nesse processo (Wassano et al., 2020). Diversos são os mecanismos que podem atuar regulando os processos celulares envolvidos na adaptação dos fungos patogênicos na relação parasito-hospedeiro. Uma maneira rápida e econômica é através de modificações pós-traducionais (PTMs) das proteínas relacionadas às vias celulares que regulam esses processos biológicos (Wassano et al., 2020). Entre as PTMs já identificadas em fungos podemos citar fosforilação, metilação, crotonilação e acetilação (Retanal et al., 2021).

A acetilação é uma das PTMs mais abundantes e é caracterizada pela adição de um grupo acetil na região ϵ -amino dos resíduos de lisina. Essa PTM neutraliza a carga positiva da lisina e pode conferir novas propriedades as proteínas modificadas, compreendendo mudanças na atividade enzimática, localização subcelular e interação com DNA. Além disso, a acetilação também é encontrada nas regiões N-terminais das proteínas, modificando resíduos de metionina, serina e treonina, desempenhando papel importante na síntese, estabilidade e localização subcelular de proteínas (Chen et al., 2020).

A acetilação de lisinas foi descrita pela primeira vez nas caudas N-terminais de histonas, associada a regulação da estrutura da cromatina e regulação da expressão gênica (Allfrey et al., 1964). Por muitos anos o foco de estudo dessa PTM foi seu papel na regulação da expressão gênica, mas com o aprimoramento das metodologias de proteômica foi possível identificar a presença da acetilação em milhares de proteínas não-histônicas em diferentes procariotos e eucariotos, envolvidas em diversos processos celulares (Narita et al., 2019).

O primeiro acetiloma de um fungo patogênico foi descrito em 2016 por Zhou et al (Zhou et al., 2016). Os autores identificaram 1073 lisinas acetiladas (K-ac) em 477 proteínas em *Candida albicans* (Zhou et al., 2016). Em seguida, diversos outros estudos descreveram os acetilomas de mais de uma dezena de fungos patogênicos, como *Trichophyton rubrum*, *Yarrowia lipolytica*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus flavus* (Li et al., 2019; Wang et al., 2017; Xu et al., 2018). A partir desses estudos verificou-se que a acetilação está presente em proteínas de diferentes compartimentos celulares e envolvidas em muitos processos celulares (Wassano et al., 2020), como divisão celular, metabolismo, controlar a transformação morfológica, formação de biofilme e resposta ao estresse oxidativo (Narita et al., 2019).

1.5. Regulação dos níveis de acetilação proteica

A adição, remoção e reconhecimento dos grupos acetil nas lisinas é coordenado pelas lisinas acetiltransferases (KATs), lisinas desacetilases (KDACs) e proteínas contendo bromodomínios (BDPs). As KATs adicionam grupos acetil nas lisinas, enquanto as KDACs removem esses grupos. Já as BDPs se ligam as lisinas acetiladas e atuam recrutando proteínas que irão agir nas etapas seguintes (Marmorstein e Zhou, 2014; Seto e Yoshida, 2014; Fujisawa e Filippakopoulos, 2017).

As KATs são agrupadas com base na similaridade de sequência de seus domínios de acetiltransferase em dois grupos principais, A e B, sendo que no grupo A encontramos proteínas de localização nuclear, enquanto no grupo B temos proteínas citoplasmáticas. As famílias mais comuns incluem GNAT, MYST, Hat1 e p300/CBP (Marmorstein e Zhou, 2014). As KDACs são subdivididas em quatro classes (I, II, III/sirtuínas, IV). As classes I, II e IV são categorizadas com base na similaridade de sequência com as desacetilases de levedura, Rpd3, Hda1 e HDAC11, respectivamente. Classe III KDACs, também chamadas de sirtuínas, são homólogas à Sir2 de levedura e requerem nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) como co-fator para sua atividade catalítica (Seto et al., 2014). Como este trabalho é focado nas KDACs, iremos detalhar melhor essa classe nos tópicos seguintes.

1.6. Lisinas desacetilases (KDACs)

As KDACs estão divididas em dois grupos, as histonas desacetilases e as sirtuínas, que formam quatro classes (I–IV) baseado nos seus mecanismos de reação e na homologia de sequência. As classes I, II, e IV compreendem as histonas desacetilases e utilizam o íon de zinco como cofator para reação catalítica (Spinck et al.,2021). O íon de zinco (Zn²⁺) é importante para estabilizar o substrato acetilado no centro catalítico da enzima, polarizando o grupo carbonila e assim tornando o carbono um alvo melhor para a molécula de água nucleofílica (Eckschlager et al.,2017). Já as enzimas da classe III irão utilizar o NAD⁺ como co-fator, que no final da reação de desacetilação vão formar O-acetil ADP ribose, nicotinamida e a lisina desacetilada (Eckschlager et al.,2017).

As KDACs da classe I de mamíferos correspondem as HDAC1, 2, 3 e 8, sendo essas homólogas a proteína de levedura Rpd3 (Liu et al.2021). É importante destacar que somente a HDAC8 é uma enzima isolada funcionalmente, enquanto HDAC1, 2, 3 sempre irão atuar em complexos com outras proteínas. Esses complexos atuam provocando a repressão da expressão

gênica (Watson et al., 2012). Já as KDACs Classe II em mamíferos se dividem em dois subgrupos, Classe IIa e Classe IIb. A primeira engloba as HDAC4, 5, 7 e 9; enquanto a segunda, possui as HDAC6 e 10. Uma característica das KDACs Classe IIa é possuírem uma histidina substituindo a tirosina característica do no seu sítio ativo, afetando a atividade de desacetilação desse grupo de enzimas (Toro e Watt, 2020).

As KDACs Classe III são as sirtuínas que em mamíferos se classificam SIRT1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, e também são subclassificadas baseada em sua filogenia. As sirtuínas são caracterizadas por possuírem dois domínios, um domínio grande chamado de Rossmann-fold e um domínio pequeno de ligações do íon de zinco. O sítio catalítico é conservado e reside entre os dois domínios, numa espécie de sulco formando um túnel na proteína, no qual o substrato interage com o NAD⁺ (Yoshida et al.,2017).

Por fim, a Classe IV apresenta somente um único membro, a HDAC11 (Dyke et al.,2014). A HDAC11 pode desacetilar histonas e algumas proteínas não histonas (Shukla e Tekwani, 2020).

1.7. Maquinaria de regulação da acetilação proteica em fungos

O repertório de proteínas que compõem a maquinaria de regulação dos níveis de acetilação em fungos varia entre as diferentes espécies. Enquanto *S. cerevisiae* possui 3 KATs e 10 KDACs; *A. fumigatus* possui 8 KATs e 10 KDACs; e *C. albicans* possui 8 KATs e 11 KDACs, o que pode refletir os ambientes enfrentados por cada espécie durante seu ciclo de vida. No entanto, poucas são as proteínas pertencentes a maquinaria de regulação da acetilação proteica que tiveram sua função caracterizada em fungos patogênicos (Wassano et al., 2020; Chen et al.,2020).

As KDACs de *S. cerevisiae* são as mais bem estudadas entre as espécies de fungos. Foram caracterizadas 10 KDACs em *S. cerevisiae* divididas em três classes: classe 1 (Rpd3, Hos1 e Hos2), classe 2 (Hda1 e Hos3) e classe III, sirtuínas (Sir2, Hst1, Hst2, Hst3 e Hst4). No geral, muitas dessas enzimas desacetilam proteínas não histonas. (Sauty et al.,2020).

Em fungos patogênicos, como *Criptococcus neoformans*, 13 genes que codificam para KDACs estão presentes, sendo 5 da classe I (Rpd3, Hos1, Hos2, Clr 61 e Clr2); 2 da classe II (Hda1 e Hos3); e 6 genes da classe das sirtuínas (Sir2, Hst1, Hst2, Hst3, Hst4 e Hst5) (Li et al., 2019). Tentativas de obter linhagens nocautes para todas as KDACs de *C. neoformans* demonstraram a essencialidade de apenas um dos genes, DAC12. Ensaios para avaliar fatores de virulência das linhagens mutantes identificaram redução na produção de melanina e na formação da cápsula para os mutantes de Hos2, Hda1, Rpd3 e DAC11; enquanto nocautes para Hos2 e

Hda1 apresentaram redução significativa na infectividade em modelos murinos de infecção *in vivo* (Li et al., 2019).

Em *A. fumigatus* entre os 10 genes que codificam para KDACs, 4 pertencem a classe I e II (RpdA, HosA, HosB e HdaA) e 6 a classe das sirtuínas (SirA, SirB, SirC, SirD, SirE e HstA) (Wassano et al., 2020). Estudos de caracterização dessas enzimas mostraram que a classe I KDAC, RpdA é essencial para o crescimento de *A. fumigatus* e que a redução de sua expressão em ensaios de infecção em animais elimina a virulência do fungo (Bauer et al.,2019).

As KDACs presentes no fungo *C. albicans* se classificam em 3 classes, sendo 11 genes divididos, na qual 4 pertencem a classe I (Hos1, Hos2, Rpd31, Rpd3), 2 na classe II (Hda1 e Hos3) e 4 na classe III (Sir2, Hst1, Hst2 e Hst3). Outra HDAC é a Set3 que não se enquadra nas classes anteriores. E assim como a classe III também é NAD⁺ dependente (Garnaud et al.,2016).

1.8. KDACs como inibidores de fungos

Considerando o papel que as enzimas reguladoras dos níveis de acetilação proteica, como as KDACs, podem ter em diversos processos celulares, elas têm sido exploradas como alvos de drogas para o tratamento de diferentes doenças, como por exemplo, diabetes, câncer, doenças neurodegenerativas e doenças infecciosas (Wang et al., 2015). Alguns inibidores de KDACs já foram desenvolvidos e testados em ensaios clínicos contra essas doenças, no entanto, o potencial de se explorar essas enzimas como alvos de drogas ainda é muito vasto.

Esses inibidores de KDACs podem ser naturais ou sintéticos e normalmente consistem numa fração de ligação a metal ou grupo funcional, um grupo *capping* e um ligante. O processo consiste, na qual o grupo de ligação ao metal ajuda na ligação do metal catalítico ao sítio das HDACs. O grupo *capping* interage com os aminoácidos no sítio de ligação da lisina, enquanto o ligante com semelhança de estrutura com a cadeia de carbono presente no substrato acetil-lisina, conecta o grupo de ligação e *capping* metálico para interação com o sítio ativo da HDAC (Shukla e Tekwani et al.,2020).

Um dos inibidores das KDACS class I e II é a Tricostatina A (TSA-A), que é um antibiótico produzido por *Streptomyces hygroscopicus*, que demonstrou ser promissor para o tratamento de infecções por *Aspergillus fumigatus* em combinação com o azol (Lamoth et al.,2014; Robbins et al.2012). Outro inibidor de HDACs com ação antifúngica é o butirato de sódio (SB) possui atividade antifúngica contra as infecções pelas espécies de *Candida spp* e *C. neoformans* (Nguyen et al.,2011).

1.9. Ferramentas computacionais no estudo estrutural e funcional de proteínas

Recentemente, a área de predição estrutural de proteínas obteve um grande avanço com o lançamento da ferramenta AlphaFold. O AlphaFold é uma ferramenta revolucionária que foi desenvolvida pela empresa DeepMind, que utiliza um algoritmo de aprendizado de máquinas a partir de modelos tridimensionais de proteínas solucionadas experimentalmente para descrever a estrutura predita de proteínas a partir de uma sequência de aminoácidos (Serpell et al.,2021). Após o seu lançamento, já foram apresentados modelos tridimensionais preditos de todo proteoma humano (David et al.,2022). Inicialmente, o AlphaFold apresentou mais de 360.000 estruturas de 21 proteomas de organismos modelos, acredita-se que brevemente esse número deve subir acima dos 100 milhões e assim representando o conjunto de dados UniRef90 (Varadi et al.,2021).

O AlphaFold abrange conteúdos programáticos e de visualização interativa de alta-definição, permitindo análises estruturais de cadeias de proteínas, coordenadas atômicas, estimativas de erros de predição por resíduos e o grau de confiança do modelo (Varadi et al., 2022). Assim, o AlphaFold fornece a comunidade científica a predição de qualquer sequência de aminoácidos, onde, baseado nas estimativas do programa, pode-se chegar em modelos com alta confiança (Jumper et al.,2021).

Assim, essa ferramenta tem o potencial de revolucionar diferentes áreas de estudos e permitirá que avancemos de maneira considerável na identificação e caracterização de proteínas de diferentes patógenos, incluindo espécies de fungos, que futuramente poderão ser exploradas como alvos de drogas para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças causadas por agentes infecciosos, como os fungos.

1.10. Objetivos

Dentro desse contexto, o presente trabalho buscou fazer um estudo estrutural das famílias das KDACs de duas espécies de fungos patogênicos, *A. fumigatus* e *C. albicans*, com intuito de gerar informações importantes sobre as enzimas desses fungos e que possam ser exploradas com para o desenvolvimento de inibidores específicos para possível tratamento das doenças causadas por esses organismos.

No fim, pretendemos com essas informações contribuir para validação dessas enzimas como potenciais alvos terapêuticos.

2. Materiais e Métodos

Para realizar todas as análises deste trabalho, utilizamos as espécies de fungos patogênicos *C. albicans* e *A. fumigatus*. Em paralelo, para fins de comparação utilizamos o organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*, e nas análises relacionadas a explorar o potencial das KDACs como alvos de drogas em *C. albicans* e *A. fumigatus* também utilizamos as HDACs de *Homo sapiens*. Inicialmente, foram obtidas as sequências de aminoácidos de cada uma das proteínas de interesse utilizando seus os códigos de acesso no banco de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org>). O código de acesso referente a cada proteína estudada pode ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. KDACs utilizadas neste estudo e seus respectivos número de acesso no Uniprot.

| Espécie | Classe I | Uniprot | Classe II | Uniprot |
|-----------------------------|-----------------|----------------|-------------------|----------------|
| <i>S. cerevisiae</i> | Hos1 | Q12214 | Hos3 | Q02959 |
| | Hos2 | P53096 | Hda1 | P53973 |
| | Rpd3 | P32561 | | |
| <i>C. albicans</i> | Hos1 | A0A1D8PMG7 | Hos3 | A0A1D8PLH8 |
| | Hos2 | A0A1D8PJ17 | Hda1 | Q5A960 |
| | Rpd3 | A0A1D8PSA6 | | |
| | Rpd31 | Q5ADP0 | | |
| <i>A. fumigatus</i> | RpdA | Q4WI19 | HdaA | Q4WE71 |
| | HosA | Q4WHY0 | HdaB | Q4W9N7 |
| <i>Homo Sapiens</i> | | | Classe IIa | |
| | Hdac1 | Q13547 | Hdac4 | P56524 |
| | Hdac2 | Q92769 | Hdac5 | Q9UQL6 |
| | Hdac3 | O15379 | Hdac7 | Q8WUI4 |
| | Hdac8 | Q9BY41 | Hdac9 | Q9UKV0 |
| | | | Classe IIb | |
| | | | Hdac6 | Q9UBN7 |
| | | | Hdac10 | Q969S8 |

Em seguida, determinamos a posição do domínio de HDAC de cada proteína com a ferramenta *InterPro Classification of protein families* disponível no sítio Web <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>. Assim, com as sequências de aminoácidos da proteína total e somente da região correspondente ao domínio HDAC, realizamos os alinhamentos dessas sequências, segundo cada classe de HDAC de cada espécie, por meio da ferramenta Clustal Omega <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Tais alinhamentos serviram para identificar o grau de conservação entre as sequências e localizar os resíduos de seus sítios ativos. Utilizando os dados de conservação entre as sequências de cada classe de HDAC entre as espécies foram gerados os *heat-maps* com o software Prism 8.

Os modelos tridimensionais preditos das proteínas estudadas no presente trabalho foram obtidos através do software AlphaFold, utilizando o AlphaFold Colab, disponível no site: <https://colab.research.google.com/github/deepmind/alphafold/blob/main/notebooks/AlphaFold.ipynb?authuser=1>. Em paralelo, como suporte metodológico utilizamos o AlphaFold Protein Structure Database no site <https://alphafold.ebi.ac.uk>. É importante ressaltar que a proteína HdaB da classe II de *A. fumigatus*, foi obtida pelo software SwissModel, disponível no site <https://swissmodel.expasy.org>. A opção para obtenção da estrutura predita desta proteína pelo SwissModel se explica pelo fato do AlphaFold ainda ter certa dificuldade em prever a estrutura de proteínas de tamanho elevado, como é o caso da AfHdaB.

Todas as análises estruturais, como a estrutura global e posição de seus sítios ativos para cada proteína das classes I e II das KDACs foram feitas por meio do software Pymol 2.5, o qual está disponível para download através do sítio web <https://pymol.org/2/> ou ChimeraX. Os modelos em .pdb gerados foram então utilizados para ensaios de docking molecular com Tricostatina A (TSA-A), um inibidor de HDACs classe I e II de mamíferos. Os dockings foram realizados com o software PyRx-Virtual Screening Tool, uma ferramenta que avalia as possíveis conformações de ligação do ligante oferecido à macromolécula. Utilizou-se a opção Vina Wizard, onde foi feito o upload do ligante e das macromoléculas (modelos tridimensionais gerados). Executa-se o Run Vina, e o programa gera arquivos em .pdbqt com a macromolécula e as opções de conformação de ligante com uma classificação de afinidade de ligação para cada conformação. Os arquivos foram então convertidos para .pdb e abertos no software Chimera 1.14 para visualização e obtenção de imagens com o ligante na conformação desejada.

Todas as imagens apresentadas no trabalho foram processadas utilizando software Adobe Ilustrador.

3. Resultados

3.1. Identificação das KDACs de *C. albicans* e *A. fumigatus*

Baseado na literatura e como mencionado no tópico de introdução *C. albicans* possui 10 genes que codificam para KDACs, *A. fumigatus* 8 e *S. cerevisiae* 10 (Wassano et al., 2020). As KDACs de *S. cerevisiae* são divididas em três classes: classe 1 (Rpd3, Hos1 e Hos2), classe 2 (Hda1) e classe III, sirtuínas (Sir2, Hst1, Hst2, Hst3 e Hst4) (Wassano et al., 2020). Assim, considerando a classificação de *S. cerevisiae* e os dados da literatura classificamos as KDACs de *C. albicans* e de *A. fumigatus* em três classes, sendo os membros de *C. albicans* divididos em classe I (Hos1, Hos2, Rpd3 e Rpd31), classe II (Hos3 e Hda1) e classe III (Hst1, Hst2, Hst3 e Sir2); e os de *A. fumigatus* em classe I (RpdA e HosA), II (HosB e HdaA) e classe III (SirA, SirB, SirC, SirD, SirE e HstA).

Enquanto *S. cerevisiae* e *A. fumigatus* apresentam um número maior de membros da classe III, cinco e seis, respectivamente, *C. albicans*, possui um número maior de membros pertencentes a classe I e II. Essas diferenças podem estar relacionadas a biologia de cada espécie de fungo e refletir as adaptações que cada espécie precisa realizar em seu habitat natural. Na Tabela 2, destacamos alguns detalhes das KDACs das três espécies.

Devido ao grande número de KDACs encontradas nas três espécies de interesse neste trabalho, decidimos focar as demais análises somente nas classes I e II. Desta maneira, obtivemos as sequências de aminoácidos de todas estas proteínas que foram exploradas nas análises subsequentes.

Tabela 2. Detalhamento das KDACs utilizadas neste estudo e seus respectivos número de acesso no Uniprot, Aminoácidos e kDa.

| Espécie | Proteína | UniprotID | Aminoácidos (n) | kDa |
|--------------------|----------|------------|-----------------|-------|
| <i>C. albicans</i> | | | | |
| Classe I | | | | |
| | Hos1 | A0A1D8PMG7 | 436 | 49,18 |
| | Hos2 | A0A1D8PJ17 | 454 | 51,88 |
| | Rpd3 | A0A1D8PSA6 | 480 | 54 |
| | Rpd31 | Q5ADP0 | 577 | |
| Classe II | | | | |
| | Hos3 | A0A1D8PLH8 | 713 | 81,95 |
| | Hda1 | Q5A960 | 833 | 92,91 |
| Classe III | | | | |

| III | | | | |
|----------------------|------|--------|-------|--------|
| | Hst1 | Q5AQ47 | 655 | 74,33 |
| | Hst2 | Q5A985 | 331 | 37,52 |
| | Hst3 | Q5A1W9 | 487 | 55,08 |
| | Sir2 | O59923 | 519 | 58,27 |
| <i>A. fumigatus</i> | | | | |
| Classe I | | | | |
| | RpdA | Q4WI19 | 688 | 76,03 |
| | HosA | Q4WHY0 | 487 | 54,34 |
| Classe II | | | | |
| | HdaA | Q4WE71 | 602 | 65,42 |
| | HdaB | Q4W9N7 | 1,191 | 127,23 |
| Classe III | | | | |
| | SirA | Q4WQA4 | 493 | 54,61 |
| | SirB | Q4WHC4 | 425 | 46,91 |
| | SirC | Q4WMP3 | 318 | 34,66 |
| | SirD | Q4WFZ3 | 403 | 45,18 |
| | SirE | Q4WT50 | 614 | 67,13 |
| | HstA | Q4WET3 | 381 | 41,53 |
| <i>S. cerevisiae</i> | | | | |
| Classe I | | | | |
| | Hos1 | Q12214 | 470 | 54,76 |
| | Hos2 | P53096 | 452 | 51,45 |
| | Rpd3 | P32561 | 433 | 48,9 |
| Classe II | | | | |
| | Hos3 | Q02959 | 697 | 79,2 |
| | Hda1 | P53973 | 706 | 80,07 |
| Classe III | | | | |
| | Hst1 | P53685 | 503 | 57,7 |
| | Hst2 | P53686 | 357 | 39,97 |
| | Hst3 | P53687 | 447 | 50,52 |
| | Hst4 | P53688 | 370 | 41,76 |
| | Sir2 | P06700 | 562 | 63,26 |

3.2. Identidade de sequência das KDACs de *C. albicans* e *A. fumigatus*

Para iniciar as análises das KDACs (Classes I e II) de *C. albicans* e *A. fumigatus* comparamos a identidade de sequência das enzimas de cada espécie com as proteínas do organismo modelo *S. cerevisiae*. Nestas análises, foram utilizadas as proteínas na sua forma nativa e consideramos percentagem de identidade entre 0-100%, sendo 0-40% baixo; 41-60% médio; e 61-100% alta.

Ao analisarmos as percentagens de identidade das enzimas pertencentes a classe 1 das KDACs, percebemos que as proteínas ScRpd3, CaRpd31 e AfRpdA, de *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *A. fumigatus*, respectivamente, possuem taxa de identidade variando entre 60-100% (Figura 1). Porém ao avaliarmos os dados das proteínas da mesma classe I, ScHos1, CaHos2, AfHosA, essa

percentagem diminui, ficando entre os 50%, considerado um grau de semelhança médio. No contexto geral, as KDACs da classe I de *C. albicans*, *A. fumigatus* e *S. cerevisiae* poderiam ser consideradas como tendo grau de identidade médio entre si (Figura 1).

Realizamos as mesmas análises para as KDACs da classe II das três espécies e verificamos que ao comparar ScHda1, CaHda1, AfHdaA, AfHdaB, a identidade de sequência entre elas é baixa, inferior aos 40% (Figura 1). No entanto, ao avaliarmos CaHda1 com ScHda1, ou CaHos3 e ScHos3, a percentagem de identidade é média (~55%) (Figura 1). Assim, podemos concluir que no geral o grau de identidade entre as proteínas da classe II entre as três espécies é baixo, ou seja, inferior aos 40%.

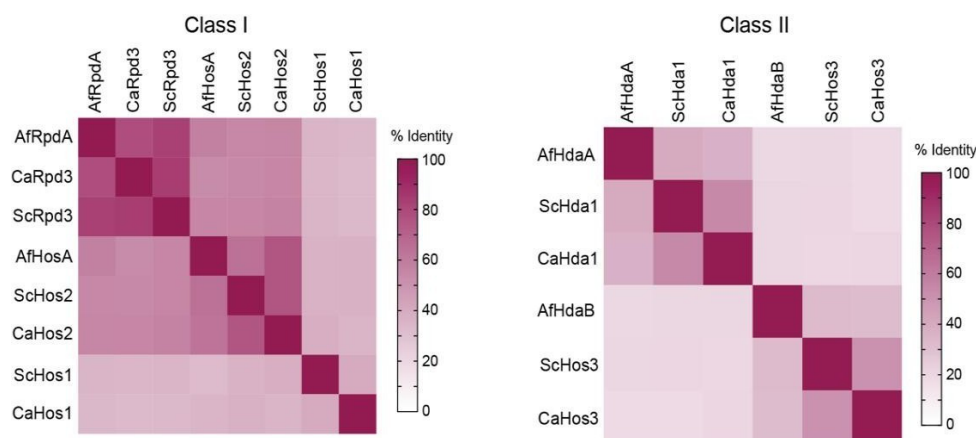


Figura 1. Percentagem de identidade de sequência das classes I e II das KDACs de *C. albicans*, *A. fumigatus* e *S. cerevisiae*. Foram utilizadas as sequências das proteínas nativas das enzimas pertencentes as classes I e II e a percentagem de identidade entre elas foi utilizada para construção do heat-map no software Prism 8. De maneira o grau de identidade entre as proteínas da classe I é considerado médio (entre 41-60%), enquanto que da classe II é considerado baixo (inferior a 40%).

3.3. Análise filogenética das KDACs classe I e II de *C. albicans* e *A. fumigatus*

Ao examinar a árvore filogenética podemos observar as diferenças em relação a cada espécie e classe, segundo o seu grau de identidade. No caso da classe I, em relação as proteínas CaHos2 e ScHos2 podemos sugerir que existe afinidade/similaridade entre elas, pois se encontram na mesma ramificação, enquanto a proteína AfHosA mesmo estando no mesmo patamar da ramificação apresenta um distanciamento filogenético quando comparado com as outras duas (Figura 2). Cenário semelhante é observado quando avaliamos as proteínas CaHos1 e ScHos1, que parecem derivar de uma mesmo ancestral, mas divergem logo em seguida, dando origem a ramos distintos (Figura 2). Já para as proteínas ScRpd3, CaRpd31, CaRpd3 e AfRpdA, verificamos o surgimento a partir de um mesmo ramo, porém ocorrer uma subramificação que

separa AfRpdA das demais (Figura 2).

Nas análises da classe II das KDACs, as proteínas CaHos3 e ScHos3 apresentam maior similaridade filogenética, já que derivam de um mesmo ancestral e permanecem no mesmo ramo evolutivo; enquanto AfHdaB é a enzima mais distante do ponto de vista filogenético comparado com as demais proteínas da classe II (Figura 3). No caso das proteínas CaHda1, ScHda1 e AfHdaA verificamos uma origem comum, que depois dá origem a dois ramos, um contendo AfHdaA e outro contendo ScHda1 e CaHda1 (Figura 3).

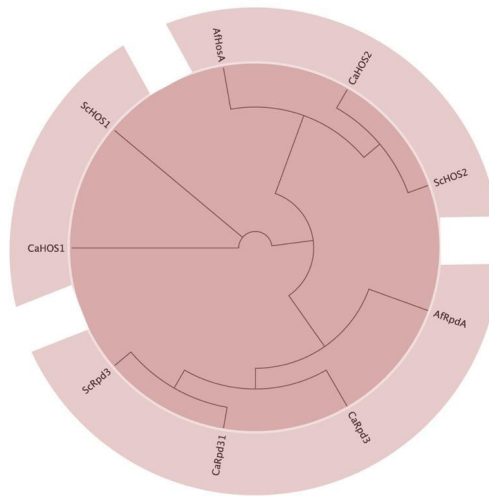


Figura 2. Árvore filogenética dos membros da classe I das KDACs de *C. albicans*, *A. fumigatus* e *S. cerevisiae*. Para as análises foram utilizadas as sequências nativas de todos os membros pertencentes a classe I e as análises foram feitas utilizando o software Geneious Prime. Sc (*S. cerevisiae*); Ca (*C. albicans*); Af (*A. fumigatus*).



Figura 3. Árvore filogenética dos membros da classe II das KDACs de *C. albicans*, *A. fumigatus* e *S. cerevisiae*. Para as análises foram utilizadas as sequências nativas de todos os membros pertencentes a classe I e as análises foram feitas utilizando o software Geneious Prime. Sc (*S. cerevisiae*); Ca (*C. albicans*); Af (*A. fumigatus*).

3.4. Obtenção das estruturas preditas das KDACs classe I e II de *C. albicans* e *A. fumigatus*

Utilizando as sequências dos aminoácidos correspondentes ao domínio de HDAC das enzimas das classes I e II das espécies de *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *A. fumigatus* geramos os modelos tridimensionais preditos das proteínas pelo software AlphaFold. Todos os modelos gerados são apresentados na Figura 4.

Os modelos tridimensionais gerados pelo AlphaFold produzem uma métrica de confiança por resíduo de aminoácido chamada de teste de diferença de distância local prevista (pLDDT), que varia de uma escala entre 0 a 100. A pLDDT estima o quão bem a previsão concordaria com uma estrutura experimental baseando-se no teste de diferença de distância local Ca (IDDT-Ca), gerando um perfil de cores para cada região do modelo. Neste sentido, a coloração azul-escura representa intervalo de confiança entre 90-100%; azul-claro de 70-90%; amarelo de 50-70% e laranja de 0-50% (Tunyasuvunakool et al.,2021). Com base nessa métrica podemos afirmar que todos os modelos gerados possuem alta confiança (Figura 4).

Todos modelos gerados para as proteínas da classe I e II de *S. cerevisiae* (Hos1, Hos2, Rpd3, Hda1 e Hos3) apresentaram intervalo de confiança entre 90 e 100%, como pode ser observado pela presença majoritária da cor azul no modelo (Figura 4). Somente nas extremidades dos modelos foram verificadas regiões com colorações azul-claro e laranja, indicando taxa de confiança variando entre 50-90%, porém isso não impactaria no uso desses modelos nas análises seguintes.

De maneira semelhante todos os modelos gerados para *C. albicans* (Hos1, Hos2, Rpd3, Rpd31, Hda1 e Hos3) e *A. fumigatus* (HosA, RpdA, HdaA) apresentaram um intervalo de confiança entre 90-100%, representados pela cor azul-escura na estrutura dos modelos (Figura 4). A única exceção foi para a proteína HdaB que apresentou baixa taxa de confiança no modelo gerado pelo AlphaFold. Devido a isso, um modelo foi gerado utilizando a ferramenta SwissModel.

3.4.1. Análise estrutural do sítio catalítico das KDACs classe I de *C. albicans* e *A. fumigatus*

Os aminoácidos que compõem a região do sítio ativo das KDACs da classe I são altamente conservados entre diferentes organismos. Ao avaliarmos o sítio ativo da HDAC1 humana,

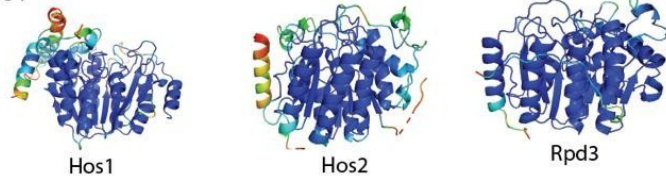
membro clássico das KDACs de classe I, verificamos que os resíduos ali presentes são representados pelas histidinas H140, H141, H178; tirosina Y303 e ácido aspártico D176 e D264. Esses resíduos formam uma região de interação com o íon de zinco, essencial para a atividade de desacetilação dessas enzimas. Vale destacar que o resíduo de tirosina 303 é importante para o ataque nucleofílico do substrato durante a reação de desacetilação (Bottomley et al., 2008; Marek et al., 2021; Yoshida et al., 2017; Toro e Watt, 2020).

Para avaliar o nível de conservação dos aminoácidos que formam o sítio catalítico na HDAC1 entre os membros da classe I de *C. albicans*, *A. fumigatus* e *S. cerevisiae*, realizamos um alinhamento das sequências de aminoácidos do domínio HDAC entre elas, e verificamos a presença de todos os resíduos que compõem o sítio catalítico conservados nas enzimas dos fungos (Figura 5). As posições dos resíduos correspondentes de cada proteína das espécies de fungos estão descritas nas Tabelas 3, 4 e 5.

Verificada a conservação dos resíduos que compõem o sítio ativo das KDACs de classe I nas três espécies de fungos por análises de sequência, o passo seguinte foi avaliar se esses resíduos também se mantinham conservados do ponto de vista de localização estrutural nas proteínas. Para isso, fomos avaliar esse fator utilizando os modelos preditos das estruturas gerados anteriormente.

A estratégia que utilizamos para estas análises consistiu inicialmente em realizar um alinhamento estrutural entre as proteínas da classe I pertencentes a mesma espécie, seguindo da identificação da localização dos aminoácidos importantes no sítio ativo na estrutura delas. Essa abordagem foi escolhida porque as enzimas da mesma espécie são muito parecidas entre elas.

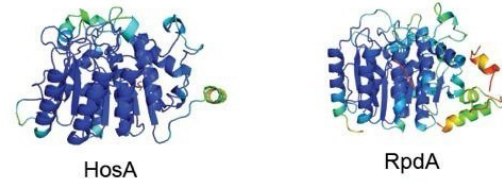
S. cerevisiae - Class I



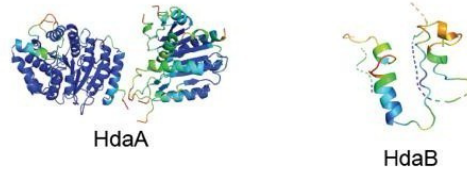
S. cerevisiae - Class II



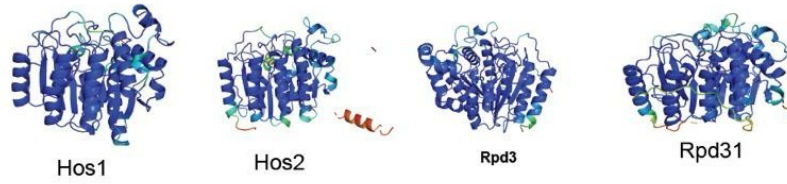
A. fumigatus - Class I



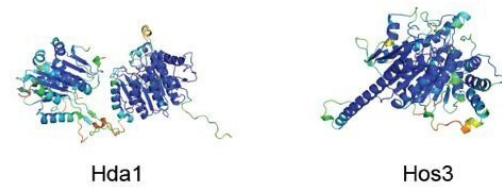
A. fumigatus - Class II



C. albicans - Class I



C. albicans - Class II



Model Confidence:



AlphaFold produces a per-residue confidence score (pLDDT) between 0 and 100. Some regions with low pLDDT may be unstructured in isolation.

Figura 4. Modelos das estruturas tridimensionais previstas das KDACs classes I e II de *C. albicans*, *A. fumigatus* e *S. cerevisiae*. As estruturas previstas foram geradas utilizando a ferramenta AlphaFold. A confiança do modelo gerado é apresentada pelo padrão de cores, sendo: azul (90-100%); azul-claro (70-90%); amarelo (50-70%) e laranja (0-50%)

| | | |
|----------|---|-----|
| Hs_HDAC1 | AVK-----LNKQQTDI AVNWAGGLHHAKKSEASGFCYVNDIVLAILLELLK-YHQRVLYID | 174 |
| Af_RpdA | AAR-----LNRNKCDI AVNWAGGLHHAKKSEASGFCYVNDIVLGILELLR-FKQRVLYVD | 183 |
| Ca_Rpd3 | AAR-----LNRGQADI AVNYAGGLHHAKKSEASGFCYTNDIVLGIIELLR-YHPRVLYID | 182 |
| Sc_RPD3 | AAR-----LNRGKCDVAVNYAGGLHHAKKSEASGFCYLN DIVLGI IELLR-YHPRVLYID | 184 |
| Ca_Rpd31 | AAR-----LNRGKCDI AVNYAGGLHHAKKSEASGFCYLN DIVLGI IELLR-YHPRVLYID | 183 |
| Af_HosA | ARK-----LCNNQSEI AVNWSGGLHHAKKAEASGFCYVNDIVLGILQLLR-HHPRVMYID | 208 |
| Sc_HOS2 | TRK-----LINNQSDI AVNWSGGLHHAKKNSPSGFCYVNDIVLSILNLLR-YHPRILYID | 192 |
| Ca_Hos2 | TRK-----LISGMSDI AVNWSGGLHHAKKFEPSGFCYVNDIVLSI INLLR-VHPRVMYID | 201 |
| Sc_HOS1 | LDH-----LSPTERLI GINWDGGRHHAFAKQORASGFCYINDVLLIQRLRKAKLNKITVVD | 245 |
| Ca_Hos1 | ARKIVQQVKETNDQII AVNWSGGLHHAKKSHAAGFCYVNDVVL SINILRK-NLGSVFYLD | 235 |
| | : : : * : * * * * * : * * * * * : * : : * : * | |
| Hs_HDAC1 | IDIHGGDGVVEEAFYTTDRVMTVSFHKYG--EYFPGTGLDRDIGA---GKGKYAVANVPL | 228 |
| Af_RpdA | IDVHHGGDGVVEEAFYTTDRVMTVSFHKYG--EYFPGTGELRDIGV---GQGHYAVNFPL | 237 |
| Ca_Rpd3 | TDVHHGGDGVVEEAFYTTDRVMTCSFHKFG--EFFPGTGNLTDIGI---GKGKYHAINIPL | 236 |
| Sc_RPD3 | IDVHHGGDGVVEEAFYTTDRVMTCSFHKYG--EFFPGTGELRDIGV---GAGKNYAVNVPL | 238 |
| Ca_Rpd31 | IDVHHGGDGVVEEAFYTTDRVMTCSFHKYG--EFFPGTGELRDIGV---GKGKYHSVNVPL | 237 |
| Af_HosA | IDVHHGGDGVVEEAFYTTDRVMTVSFHKYDKNFFPGTGLDSTGTPHPLNPGAHAVNVPL | 268 |
| Sc_HOS2 | IDLHHGGDGVVEEAFYTTDRVMTLSFHKYNG--EFFPGTGLDTEIGC---DKGKHFALNVPL | 247 |
| Ca_Hos2 | IDLHHGGDGVVEEAFYTTDRVMTVSFHKYNG--EFFPGTGSVDEVGI---GSGKNYAINVPL | 256 |
| Sc_HOS1 | FDLHHGGDGVVEEAFYTTDRVMTVSFHKYQIQTISVHLYEP--GFFPGTGLSDSRK-----DKNVNIPL | 297 |
| Ca_Hos1 | LDLHHGGDGVVEEAFYTTDRVMTVSFHKYQIQTISVHLYEP--GFFPGTGLSKSRE-----NTYNIPT | 285 |
| | * : * * * * * : * * : : * * * * : : * * * * : * * * * * : * * | |
| Hs_HDAC1 | RDGIDDES YEAFKFPVMSKVMEMFQPSAVVLQCGDLSLGDRLGCFNLTIKGHAKCVEFV | 288 |
| Af_RpdA | RDGIDDISYKSI FEPVIRSVMEWYRPEAVVLQCGDLSLGDRLGCFNLMSMRGHANCNVFV | 297 |
| Ca_Rpd3 | RDGIDDASYKSI FEPITTKIMEWYQPSAIVLQCGDLSLGDRLGPFNLMSMRGHANCNVFV | 296 |
| Sc_RPD3 | RDGIDDATYRSVFEPVIKKIMEWYQPSAVVLQCGDLSLGDRLGCFNLMSMEGHANCNVYV | 298 |
| Ca_Rpd31 | RDGIDDATYKSVFEPVISKIIEWYQPSAIVLQCGDLSLGDRLGCFNLMSMNGHANCINVY | 297 |
| Af_HosA | NDGIDDES YIQLF RDIVGACVD TYRPGAIVLQCGADSLGCDRLGCFNLNVGAHGACVAFV | 328 |
| Sc_HOS2 | EDGIDDDSYINLFKSI V DPLIMTFKPTLIVQCGADSLGHDRLGCFNLNIKAHGECVKFV | 307 |
| Ca_Hos2 | RDGIDDES YIRLFKSI MEPLITKFQPTCIVQCGADSLGYDRLGCFNLNIRAHGECVKFI | 316 |
| Sc_HOS1 | KHGCDNYSLELIASKI V NPLIERFLIEGQALIECGDGLGDRFNEWQLTRIGLSRIINI | 357 |
| Ca_Hos1 | EKGLNDSMLWIIKEI VAPLISNFGPRAIVIQCGDGLALDTHKEWNMTIKGYRDSIDWI | 345 |
| | ..* : * : : : . * : : * * * * * : : : : . : : | |
| Hs_HDAC1 | -KSF-NLPMLMLGGGGYTIRNVARCWTYETAVALDT--EIPNE-----L----- | 328 |
| Af_RpdA | -KSF-NLPTMILGGGGYTMRNVARTWAFETGILLGE--NLGPE-----L----- | 337 |
| Ca_Rpd3 | -RSL-GVPMMLVGGGGYTIRNVARCWTYETAVALDT--EIPNE-----L----- | 336 |
| Sc_RPD3 | -KSF-GIPMMVVGGGGYTMRNVARTWCFETGLLNNV--VLDKD-----L----- | 338 |
| Ca_Rpd31 | -KSF-NIPMMVVGGGGYTMRNVARTWCFETGLLNNV--VLDKD-----L----- | 337 |
| Af_HosA | -KTF-GLPLLVVGGGGYTPRNVSRWAHETSILIDAQDLIDPN-----I----- | 370 |
| Sc_HOS2 | -KSF-GLPMLVVGGGGYTPRNVSRWAHETSILIDAQDLIDPN-----I----- | 347 |
| Ca_Hos2 | -KSF-GIPMLVVGGGGYTPRNVSRWAHETSILIDAQDLIDPN-----I----- | 356 |
| Sc_HOS1 | MKSYPRAHIFLLGGGGYNDLLMSRFYTYLTCVTKQFNSLRGCDNNSFQIDPFVDCDGD | 417 |
| Ca_Hos1 | LSHFSEIPIMLLGGGGYSHETAKCWTYLTGVSGLGV-----S-----DI-----D | 385 |
| | : : * * * * * . : : : . : : | |

Figura 5. Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos domínios de HDAC das proteínas humana (HDAC1) e das espécies de *C. albicans*, *A. fumigatus* e *S. cerevisiae* pertencentes a classe I. Os aminoácidos que compõem o sítio catalítico estão destacados em amarelo. Sc (*S. cerevisiae*); Ca (*C. albicans*); Af (*A. fumigatus*); Hs (*H. sapiens*).

Tabela 3. Resíduos pertencentes ao sítio catalítico das KDACs da classe I de *C. albicans*.

| Proteína | ASP | ASP | HIS | HIS | HIS | TYR |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Hos1 | 237 | 321 | 201 | 202 | 239 | 362 |
| Hos2 | 203 | 292 | 167 | 168 | 205 | 331 |
| Rpd3 | 184 | 272 | 148 | 149 | 186 | 311 |
| Rpd31 | 185 | 273 | 149 | 150 | 187 | 312 |

Tabela 4. Resíduos pertencentes ao sítio catalítico das KDACs da classe I de *A. fumigatus*.

| Proteína | ASP | ASP | HIS | HIS | HIS | TYR |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| RpdA | 185 | 273 | 149 | 150 | 187 | 312 |
| HosA | 210 | 304 | 174 | 175 | 212 | 343 |

Tabela 5. Resíduos pertencentes ao sítio catalítico das KDACs da classe I de *S. cerevisiae*.

| Proteína | ASP | ASP | HIS | HIS | HIS | TYR |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Hos1 | 247 | 333 | 210 | 211 | 249 | 374 |
| Hos2 | 194 | 283 | 158 | 159 | 196 | 322 |
| Rpd3 | 186 | 274 | 150 | 151 | 188 | 313 |

Iniciamos as análises de conservação estrutural com as enzimas da classe I de *C. albicans* e que após o alinhamento entre as estruturas preditas de CaHos1, CaHos2, CaRpd3 e CaRpd31 verificamos um alto grau de conservação entre elas (Figura 6A). Em seguida, utilizando os dados de alinhamento de sequência que determinaram a posição dos resíduos que compõem o sítio catalítico de cada enzima, buscamos na estrutura predita onde cada um deles se encontravam. Como podemos observar na Figura 6A, painel da direita, é possível verificar que todos os resíduos identificados anteriormente para cada enzima (ver Tabela 3) estão presentes no sítio catalítico e a distribuição de cada um é muito conservada entre CaHos1, CaHos2, CaRpd3 e CaRpd31 (Figura 6A e B).

O mesmo processo foi feito para as proteínas da Classe I do fungo *A. fumigatus*, que correspondem a AfHosA e AfRpdA. Assim como observado para as proteínas de *C. albicans*,

verificamos um alto grau de conservação estrutural entre AfHosA e AfRpdA (Figura 7A), e também a presença dos resíduos identificados pelas análises de sequência (ver Tabela 4) compondo o sítio catalítico das enzimas (Figura 7A e B).

Por último, ao analisarmos as proteínas de *S. cerevisiae*, ScHos1, ScHos2 e ScRpd3, também observamos um alto grau de conservação estrutural entre as três proteínas (Figura 8A) e novamente a presença de todos os resíduos identificados pelos alinhamentos localizados na região do sítio catalítico (Figura 8A, painel da direita e 8B).

Assim, podemos concluir que todas as enzimas que fazem parte da classe I de *C. albicans*, *A. fumigatus* e *S. cerevisiae* apresentam estrutura do seu domínio de HDAC característica e a conservação estrutural dos resíduos que são cruciais para a atividade de desacetilação.

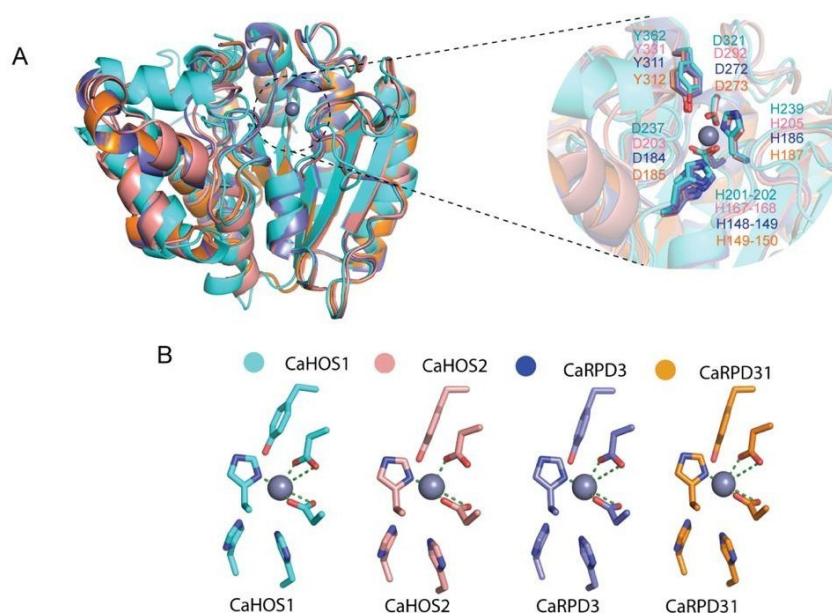


Figura 6. Estrutura predita das KDACs da classe I de *C. albicans*. A. Domínios HDACs das enzimas CaHos1, CaHos2, CaRpd3 e CaRpd31, destacando os resíduos que compõem o sítio catalítico das enzimas. B. Representação dos resíduos que compõem o sítio catalítico e suas disposições na estrutura da proteína.

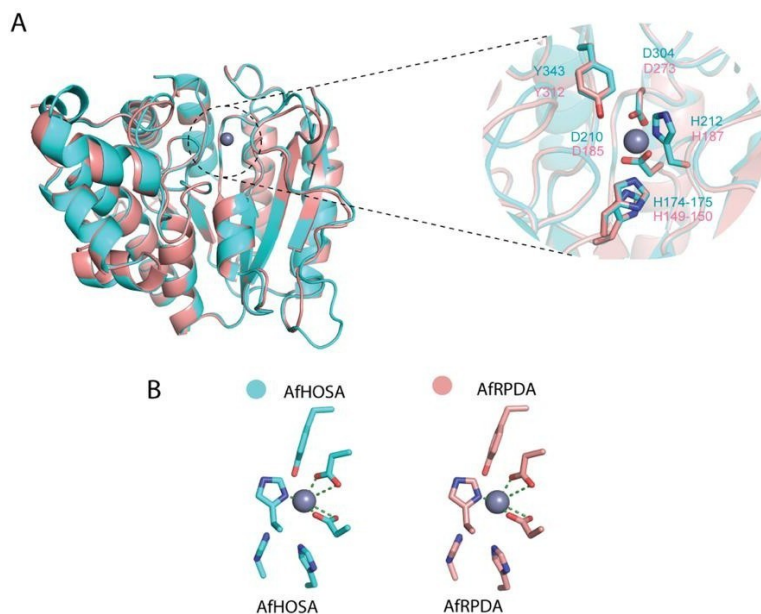


Figura 7. Localização dos resíduos do sítio catalítico na estrutura das KDACs da classe I de *A. fumigatus*. **A.** Domínios HDACs das enzimas AfHosA e AfRpdA de *A. fumigatus*, destacando os resíduos que compõem o sítio catalítico das enzimas (painel a direita). **B.** Representação dos resíduos que compõem o sítio catalítico e suas disposições na estrutura da proteína.

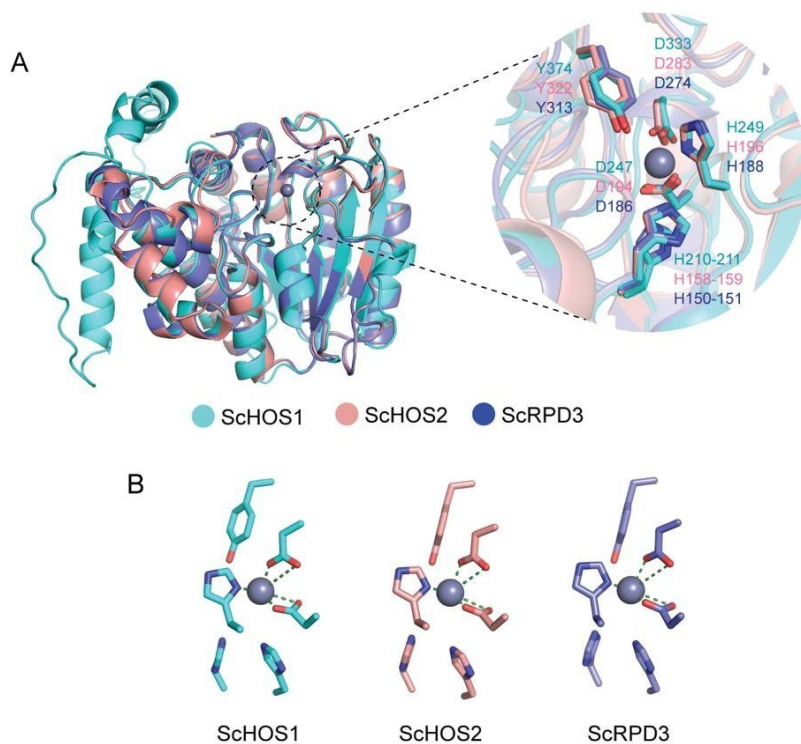


Figura 8. Localização dos resíduos do sítio catalítico na estrutura das KDACs da classe I de *S. cerevisiae*. **A.** Domínios HDACs das enzimas ScHos1, ScHos2 e ScRpd3 de *S. cerevisiae*, destacando os resíduos que compõem o sítio catalítico das enzimas (painel a direita). **B.** Representação dos resíduos que compõem o sítio catalítico e suas disposições na estrutura da proteína.

3.4.2. Análise estrutural do sítio catalítico das KDACs classe II de *C. albicans* e *A. fumigatus*

Enquanto HDAC1 é um membro clássico da classe I das KDACs em humanos, HDAC4 é o membro clássico da classe II. Do ponto de vista estrutural, membros da classe II possuem a região N-terminal mais extensa que membros da classe I, apesar de também possuírem os resíduos de histidina, tirosina e ácido aspártico formando a região do sítio catalítico (Ruijiter et al., 2004).

Em humanos, a classe II é dividida em IIa e IIb, sendo que dentro da IIa temos HDAC4, 5, 7 e 9; enquanto HDAC6 e 10 pertencem a classe IIb. A principal diferença entre os membros da classe IIa e b reside na substituição do resíduo de tirosina presente no centro do sítio catalítico e crucial para a atividade de desacetilação por uma histidina na classe IIa. Essa substituição leva a baixa atividade de desacetilação dos membros da classe IIb (Ruijiter et al., 2004).

Utilizando estratégia similar a usada para avaliar o nível de conservação dos aminoácidos que formam o sítio catalítico nas KDACs de classe II entre as proteínas de *C. albicans*, *A. fumigatus* e *S. cerevisiae*, foi feito um alinhamento das sequências de aminoácidos do domínio HDAC entre HDAC4 e as enzimas fúngicas, e verificamos a presença de todos os resíduos que compõem o sítio catalítico conservados nas enzimas dos fungos (Figura 9). As posições dos resíduos correspondentes de cada proteína das espécies de fungos estão descritas nas Tabelas 6, 7 e 8.

Ao avaliarmos a conservação do resíduo de tirosina, que normalmente é substituído nas HDACs humanas pertencentes a classe IIa por uma histidina, verificamos que em nenhuma das enzimas de *C. albicans* (CaHos3 e CaHosA), *A. fumigatus* (HdaA e HdaB) ou *S. cerevisiae* (Hda1 e Hos3), encontramos essa alteração (Tabelas 6, 7 e 8). Esses dados sugerem que todas as KDACs da classe II dos fungos aqui analisados devem ter atividade de desacetilação, para confirmar esses dados são necessários experimentos funcionais utilizando as proteínas heterólogas de cada enzima.

| | | |
|-------------------|--|------|
| HdaB.A.fumigatus | AFEGALGGVCEGVDAVFNNSN---- <td>383</td> | 383 |
| HOS3.S.cerevisiae | ALQGTIGAIETGVDSIFKGPSAEHISNRAFVAIRPPGHHCHYGTSPGFCLLNNHAHVAIEY | 217 |
| HOS3.C.albicans | AIEGVIGTIESAVDSLFSKRKKE--NHNLAFFVIRPPGHHSHACLPSGFCLLNNVQIGIEY | 337 |
| HADAC.HOMOSAPIENS | AARLAVGCVVELVFKVATG-----ELKNGFAVVRPPGHHAEESTPMGFYFNSVAVAAKL | 824 |
| HdaA.A.fumigatus | SSLLSVGGAIETCLAVATR-----KVKNAIAVIRPPGHHAEDKTMGFCLFNNVSIARV | 296 |
| HDA1.S.cerevisiae | SARLPCGGAIEACKAVVEG-----RVKNSLAVVRPPGHHAEPQAAGGFCLFSNVAVAAKN | 227 |
| HDA1.C.albicans | SAKLSGCGTIEACKAVIEG-----RVKNSLAVVRPPGHHAEPNTPAGFCLFSNVAVAAKN | 288 |
| | : * : : .. :*****. *** :... :. | |
| HdaB.A.fumigatus | AAMTH--GLTHAAILDFDLHHGDGSDIAWEQNQKAVS-----AAWNA | 424 |
| HOS3.S.cerevisiae | AYDTY--NVTHVVVLDLFDLHHGDGTQDICWKRAGFKPEE-----EPEDSSYDDFGK | 266 |
| HOS3.C.albicans | AFEQY--GVTHCAILDIDLHHGDGSDICWERAGFTGDYQQEEDIIVDPKLNPRDDYGK | 395 |
| HADAC.HOMOSAPIENS | LQQRLL--SVSKILIVDWDVHHGNGTQQAFY----- | 852 |
| HdaA.A.fumigatus | CQNKLGESCRKILIVDWDVHHGNGIQKAFY----- | 326 |
| HDA1.S.cerevisiae | ILKNYPESVRRIMILDWDIHHGNGTQKSFY----- | 257 |
| HDA1.C.albicans | MLKNYPESVRRIVIVDWDIHHGNGTQKAFY----- | 318 |
| | . : :*: *:*:* * . : | |
| HdaB.A.fumigatus | ANHKKTRIGYFSLHDIN---SFPCEYG--DVEKVRNASVCIDKAHQ---SIWNVHLETW | 476 |
| HOS3.S.cerevisiae | KFAEFPKVGYSFMHDIN---SFPTESGFATKENIKNASTCIMNSHDL---NIWNIHLSKW | 320 |
| HOS3.C.albicans | RFATYPKVGYFSIHDIK---SYPTTEIGYATKENIKNASTCIMD-HDL---NIWNVYLQEW | 448 |
| HADAC.HOMOSAPIENS | ---SDPSVLYMSLHRYDDGNFFPGS---GAPDEVG----TGPGVGFNVNMAFTGGLDPP | 901 |
| HdaA.A.fumigatus | ---DDPNVLYISLHVYQDGFYPPGDE--GDWDHCG----ADAGIGKNVNIWPWSQ---G | 374 |
| HDA1.S.cerevisiae | ---QDDQVLYVSLHRFEMGKYYPGTIQ--GYDQGTG----EGKGEFNCNITWPGV---G | 305 |
| HDA1.C.albicans | ---NDPRVLYISLHRFENGKYPGTIKY--GDLNQVG----EGPGEFTINIPWRSS---G | 366 |
| | : *.*:* . :* :. . : | |
| HdaB.A.fumigatus | KSDAEFWEIYAACYTILLEKARAFRLRHTERLL----- | 509 |
| HOS3.S.cerevisiae | TTEEEFNVLRYRTKYRTLFAKADEFRRSAKLEM----- | 352 |
| HOS3.C.albicans | SNEEFYKHYQTKYVAILNRRANQFLNSAKKQYEQEYEEYLDNLGKYNKYLLKPHLYSQPL | 508 |
| HADAC.HOMOSAPIENS | MGDAEYLAAFRTVV----- | 915 |
| HdaA.A.fumigatus | MGDGDYMYAFQQVV----- | 388 |
| HDA1.S.cerevisiae | VGDAEYMWAFQVV----- | 319 |
| HDA1.C.albicans | MHDGDYVYAFNKII----- | 380 |
| | : : : | |
| HdaB.A.fumigatus | DSAPGDTTP--KAAIFISAGFDASEWEGSGMQRHQVNVPTTEFYAKFTADVVMQAEEEGLGV | 568 |
| HOS3.S.cerevisiae | --NQQRPF--KGLVVISAGFDASEFEQTSMQRHSVNVPTSFYTTFTKDALKLAQ---MHC | 406 |
| HOS3.C.albicans | TKPTPPPPF--KPLIAISAGFDASQYENPQMQRHGINVPTSFYSTFTKDVVKLAK---IHT | 564 |
| HADAC.HOMOSAPIENS | --MPIASEFAPDVVLVSSGFDAVEGHP--TPLGGYNLSARCFGYLTKQLMGLAG----- | 965 |
| HdaA.A.fumigatus | --MPIAQEFNPDLVIVASGFDAAAGD----ELGGCFVTPSCYAHMTHMLMTLAH----- | 436 |
| HDA1.S.cerevisiae | --MPMGREFKPDLVIISSGFDAAADGD----TIGQCHVTPSCYGHMTHMLKSLAR----- | 367 |
| HDA1.C.albicans | --QPVISEFDPLIIVSSGFDAAADGD----VIGACHVTPAGYGYMTHMLKGIAR----- | 428 |
| | : :*: * . : : * :* | |
| HdaB.A.fumigatus | DGRVISVLEGGYSNRALTSGLVSHLALGDTTT---LSAIVNHEQQVGLASEMFDRLHVS | 625 |
| HOS3.S.cerevisiae | HGKVLSLMEGGYSDKAICSGVFAHLIGLQND-----WVKEWGSE---QVVKI--I-- | 452 |
| HOS3.C.albicans | NGKVL SFLEGGYSDGALSTGIFSHLIGLNNDE---FLWNHWSGSQ---QVMKE--L-- | 613 |
| HADAC.HOMOSAPIENS | --GRIVLALEGGHDLTAICDASEACVSALLGNELDPLPEKVLQQRPN--ANAVRSME----- | 1018 |
| HdaA.A.fumigatus | --GKVAVCLEGGYNFRSISKSALAVTKTLMGDPDRLHST---LPS--DLATSTVR----- | 485 |
| HDA1.S.cerevisiae | --GNLCVVLEGGYNLDAIARSALSVAKVLIGEPPELDPDL--SDPK--PEVIEMID----- | 418 |
| HDA1.C.albicans | --GKLAVILEGGYNLDSISKSALAVAKVLVGEPPENTI--T--LRPQ--AEAIEVVD----- | 477 |
| | *.: :*:* . : . : * . | |

Figura 9. Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos domínios de HDAC das proteínas humana HDAC4 e das espécies de *C. albicans*, *A. fumigatus* e *S. cerevisiae* pertencentes a classe II. Os aminoácidos que compõem o sítio catalítico estão destacados em amarelo. Sc (*S. cerevisiae*); Ca (*C. albicans*); Af (*A. fumigatus*); Hs (*H. sapiens*).

Tabela 6. Resíduos pertencentes ao sítio catalítico das KDACs da classe II de *C. albicans*.

| Proteína | ASP | ASP | HIS | HIS | HIS | TYR |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Hos3 | 355 | 528 | 315 | 316 | 355 | 576 |
| Hda1 | 308 | 399 | 266 | 267 | 308 | 439 |

Tabela 7. Resíduos pertencentes ao sítio catalítico das KDACs da classe II de *A. fumigatus*.

| Proteína | ASP | ASP | HIS | HIS | HIS | TYR |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| HdaA | 314 | 407 | 274 | 275 | 316 | 447 |
| HdaB | 399 | 529 | 361 | 362 | 401 | 580 |

Tabela 8. Resíduos pertencentes ao sítio catalítico das KDACs da classe II de *S. cerevisiae*.

| Proteína | ASP | ASP | HIS | HIS | HIS | TYR |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Hda1 | 245 | 338 | 205 | 206 | 247 | 378 |
| Hos3 | 233 | 370 | 195 | 196 | 235 | 418 |

Seguindo a mesma abordagem utilizada para as análises de conservação estrutural das proteínas da classe I, realizamos um alinhamento da estrutura das duas enzimas de *C. albicans* pertencentes a classe II (CaHos3 e CaHda1), e diferente do observado para as proteínas da classe I, CaHos3 e CaHda1 apresentam diferenças importantes do ponto de vista estrutural (Figura 10). Apesar disso, quando olhamos para a localização dos resíduos que compõem o sítio catalítico de ambas as enzimas, CaHos3 (Asp355, Asp528, His315, His316, His355 e Tyr576) e CaHda1 (Asp308; Asp399, His266, His267, His308 e Tyr439), constatamos alto grau de conservação na região da proteína que eles ocupam (Figura 10, painel da direita).

Ao contrário do observado em *C. albicans*, os membros da classe II de *A. fumigatus* (AfHdaA e AfHdaB) e de *S. cerevisiae* (ScHda1 e ScHos3), apresentam alto grau de conservação estrutural entre elas (Figuras 11 e 12). O mesmo verificamos para a localização dos resíduos que formam o sítio catalítico de cada enzima: AfHdaA (Asp314, Asp407, His274, His275, His316 e Tyr447); AfHdaB (Asp399, Asp529, His361, His362, His401 e Tyr580); ScHda1 (Asp245, Asp338, His205, His206, His247 e Tyr378); ScHos3 (Asp233, Asp370, His195, His196, His235 e Tyr418) (Figuras 11B e 12B).

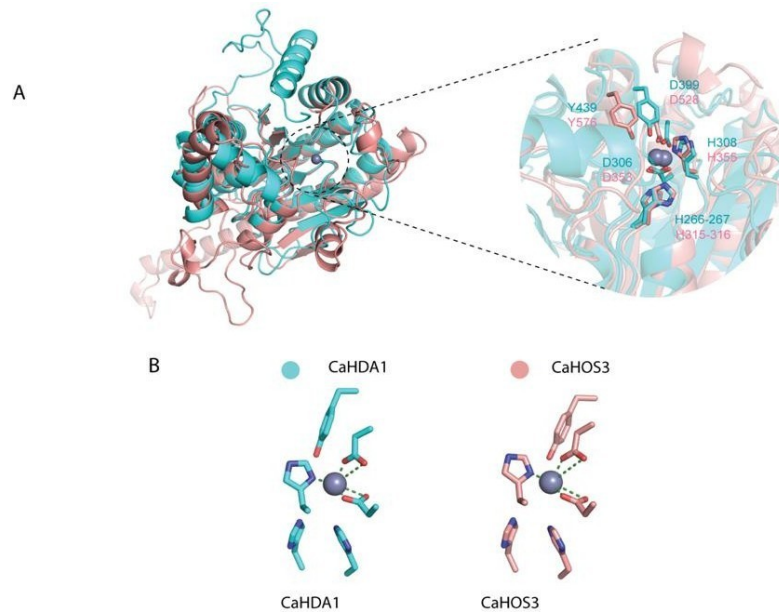


Figura 10. Localização dos resíduos do sítio catalítico na estrutura das KDACs da classe II de *C. albicans*. **A.** Domínios HDACs das enzimas CaHda1 e Hos3 de *C. albicans*, destacando os resíduos que compõem o sítio catalítico das enzimas (painel a direita). **B.** Representação da posição dos resíduos que compõem o sítio catalítico das enzimas CaHda1 e CaHos3.

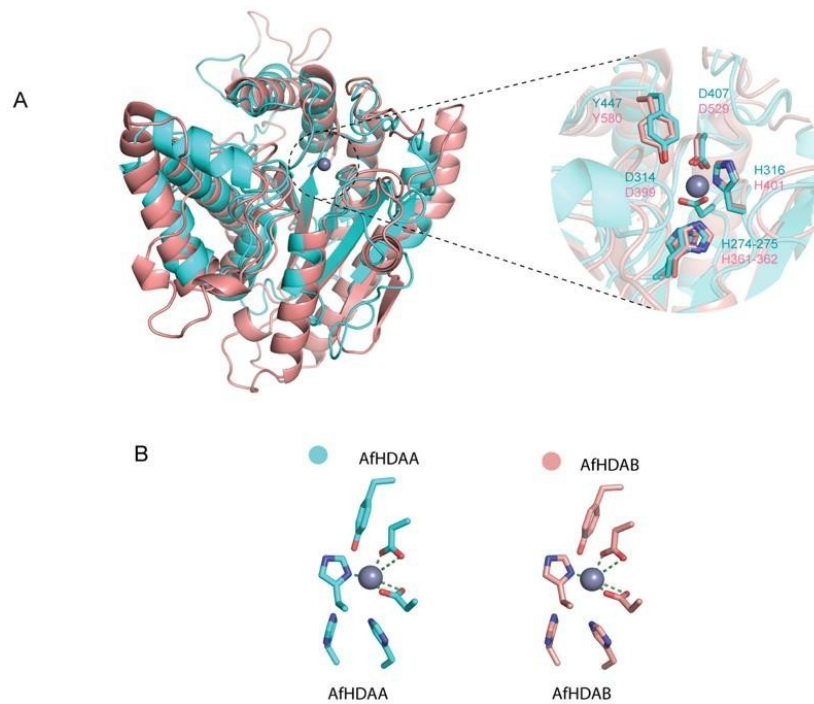


Figura 11. Análise estrutural comparativa entre as KDACs da classe II de *A. fumigatus*. **A.** Alinhamento estrutural dos domínios HDACs das enzimas AfHdaA e AfHdaB de *A. fumigatus*, destacando os resíduos que compõem o sítio catalítico das enzimas (painel a direita). **B.** Representação dos resíduos que compõem o sítio catalítico das enzimas AfHdaA e AfHdaB e suas disposições na estrutura da proteína.

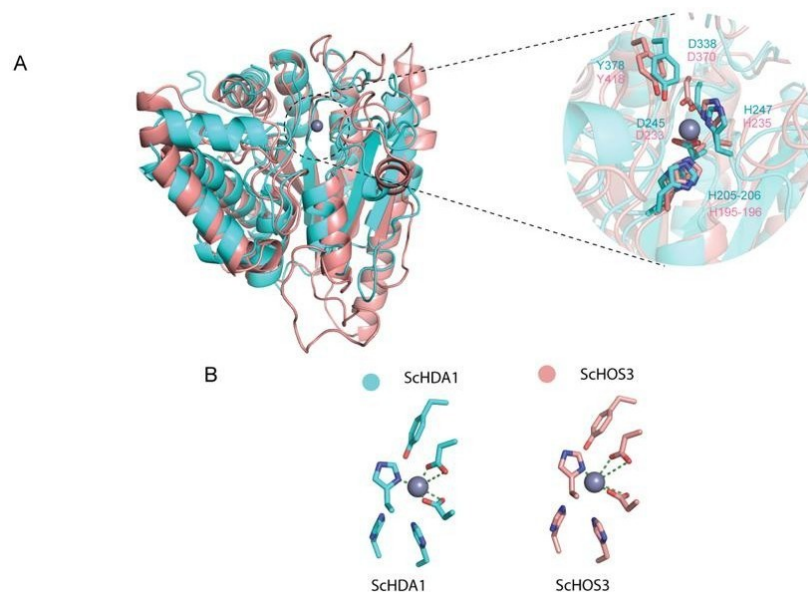


Figura 12. Comparação estrutural das KDACs da classe II de *S. cerevisiae*. **A.** Sobreposição da estrutura dos domínios HDACs das enzimas ScHda1 e ScHos3 de *A. fumigatus*, destacando os resíduos que compõem o sítio catalítico das enzimas (painel a direita). **B.** Disposição dos resíduos que compõem o sítio catalítico das proteínas ScHda1 e ScHos3 baseado nas suas localizações na estrutura de cada enzima.

Considerando todos os achados relacionados as enzimas de *C. albicans*, *A. fumigatus* e *S. cerevisiae* pertencentes a classe II fica evidente que todas elas possuem as características necessárias para atividade de desacetilação presentes. Além disso, é importante mencionar que em nenhuma delas encontramos substituição da tirosina catalítica por uma histidina, o que é característico das HDACs da classe IIa de humanos (Ruijiter et al., 2003). Além disso, não observamos a presença de dois domínios HDAC, como pode ser detectado para a HDAC6 de classe II humana, em nenhuma das enzimas fúngicas avaliadas (Ruijiter et al., 2003).

3.4.3. KDACs de *C. albicans* e *A. fumigatus* como potenciais alvos de drogas

O primeiro passo para avaliar o potencial como alvos de drogas das KDACs de *C. albicans* e *A. fumigatus*, foi comparar a identidade de sequência dessas proteínas com as de humano. Desta maneira, consideramos o intervalo entre 0-100% de identidade de sequência entre as enzimas analisadas, sendo 0-40% grau baixo de identidade; 41-60% grau médio e 61-100% grau alto de identidade. Ao compararmos as proteínas da classe I de *C. albicans* (CaRpd3, CaRpd31, CaHos1, CaHos2) e *A. fumigatus* (AfRpdA, AfHosA) com HDAC1, vemos que AfRpdA é a que apresenta o maior grau de identidade (~74%), enquanto CaHos1 possui o menor grau de identidade, ~38% (Figura 13A). As proteínas CaRpd3 e CaRpd31, também têm altos graus de identidade, 68% e 69%, respectivamente (Figura 13A). Já AfHosA e CaHos2

apresentam níveis de identidade entre 41-60% (Figura 13A).

No caso dos membros da classe II de *C. albicans* (CaHda1 e CaHos3) e *A. fumigatus* (AfHdaA e AfHdaB) ao compararmos a identidade de sequência com HDAC4, observamos em geral que elas apresentam grau de identidade médio ou baixo (Figura 13B). AfHdaA e CaHda1 possuem valor de identidade de 45 e 44%, respectivamente. Já as proteínas CaHos3 e AfHdaB apresentam níveis de identidade de 24 e 26%, respectivamente (Figura 13B).

Para melhor visualizar as diferenças observadas na identidade de sequências, selecionamos as proteínas CaHos1 e CaHos3, que apresentaram a menor identidade com HDAC1 e HDAC4 humana, para avaliarmos as diferenças estruturais entre elas. Nesse sentido, utilizando os modelos preditos dos domínios de HDAC de cada enzima realizamos um alinhamento estrutural e confirmamos que as proteínas de *C. albicans* são muito distintas das HDAC1 e 4 (Figura 14).

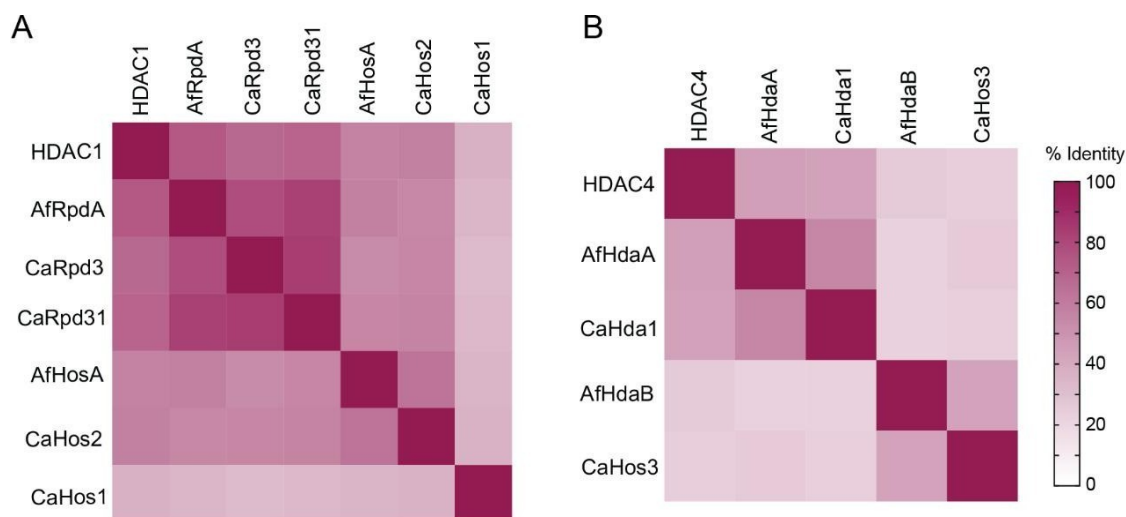


Figura 13. Identidade de sequência entre HDAC1 e 4 KDACs de *C. albicans* e *A. fumigatus* **A.** Heat-map da porcentagem de identidade entre HDAC1 e as KDACs da classe I de *C. albicans* e *A. fumigatus*. **B.** Heat-map da porcentagem de identidade entre HDAC1 e as KDACs da classe I de *C. albicans* e *A. fumigatus*.

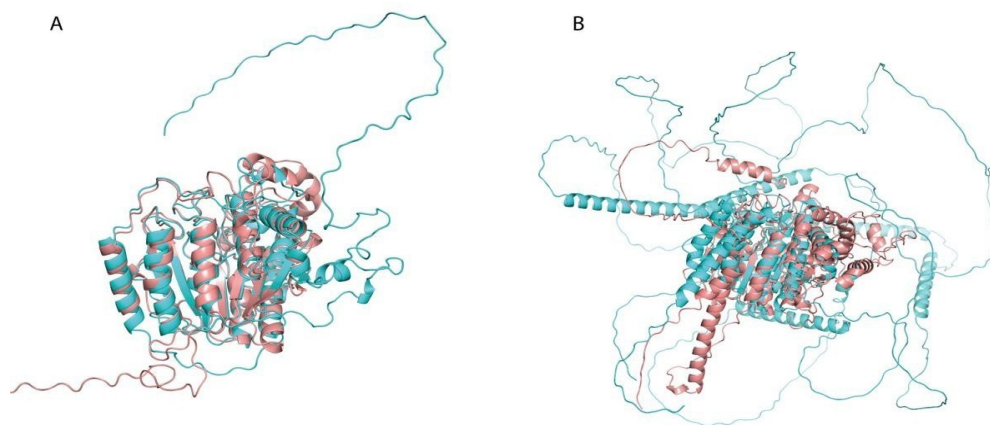


Figura 14. Análise comparativa das estruturas das HDACs humanas e de *C. albicans*. **A.** Realizamos um alinhamento estrutural entre HDAC1 (azul-claro) e CaHos1 (magenta), que apresentou a menor identidade de sequência com HDAC1. Como observado nas análises de sequência, estruturalmente essas proteínas são muito distintas. **B.** Comparação entre as estruturas preditas de HDAC4 (azul-claro) e CaHos3 (azul-claro) evidenciando as diferenças estruturais entre as duas enzimas.

Posteriormente, realizamos análises de docking para seleção de modelos estruturais mais robustos, tanto das KDACs como da TSA, para criar imagens representativas da interação do inibidor com as enzimas. Como controle dos ensaios utilizamos HDAC1 e 4 humana conforme mostra a figura a seguir:

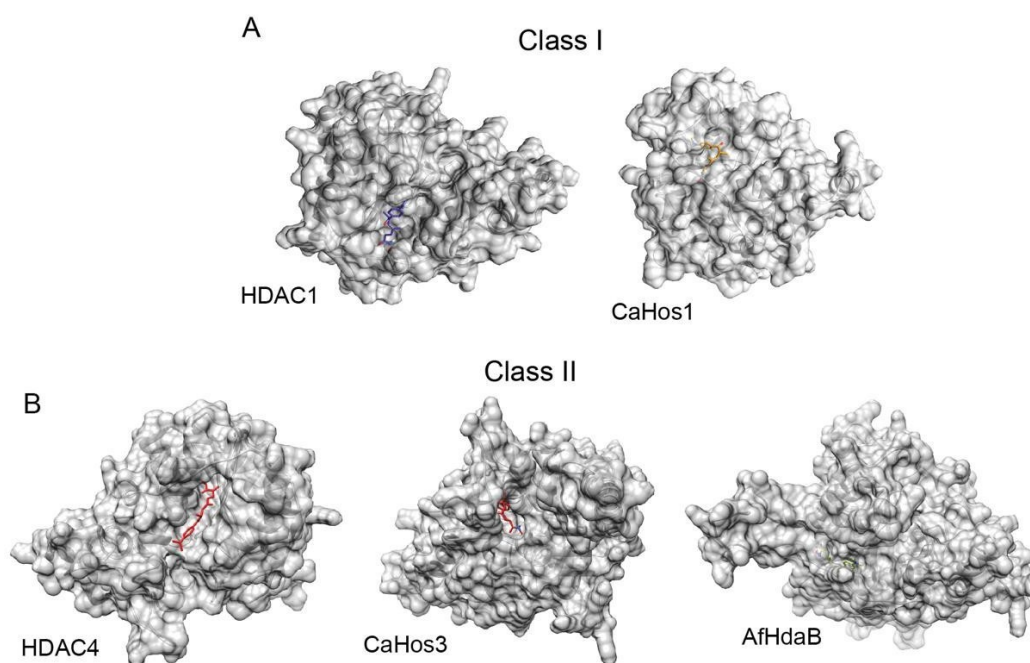


Figura 15. Análises de docking molecular das KDACs de *C. albicans* e *A. fumigatus* utilizando TSA. **A.** Docking molecular para HDAC1 e CaHos1, proteínas pertencentes a classe I das KDACs. Em ambas proteínas é possível verificar interação específica da TSA no sítio ativo. **B.** Verificamos a interação de TSA com o sítio das enzimas HDAC4 e CaHos3, pertencentes a classe II das KDACs, enquanto a interação com outro membro dessa classe, AfHdaB, fica restrita a outra região que não o sítio catalítico.

4. Discussão

Para iniciar o projeto primeiramente foi feito levantamento de dados sobre cada espécie de fungo, baseando-se em artigos publicados e revisados por Wassano et al., 2020; Sauty et al., 2020; e Chen et al., 2020. Pudemos com isso identificar as KDACs presentes em cada espécie de fungo, sendo as de *C. albicans*: classe I (Hos1, Hos2, Rpd3 e Rpd31), classe II (Hos3 e Hda1) e classe III (Hst1, Hst2, Hst3 e Sir2); as de *A. fumigatus*: classe I (RpdA e HosA), II (HosB e HdaA) e classe III (SirA, SirB, SirC, SirD, SirE e HstA); e as de *S. cerevisiae*: classe I (Rpd3, Hos1 e Hos2), classe II (Hda1 e Hos3) e classe III, (Sir2, Hst1, Hst2, Hst3 e Hst4).

Após a identificação das proteínas de *C. albicans* e *A. fumigatus*, fizemos o alinhamento das sequências de aminoácidos de cada organismo, segundo sua classe com a do organismo modelo, *S. cerevisiae*. Assim, avaliamos o grau de identidade entre as enzimas das diferentes espécies, para avaliar o quanto as proteínas de cada classe apresentam nível de similaridade e afinidade entre si. Após obtenção dos resultados do alinhamento, foi feito heat-map com os dados obtidos, e pudemos concluir que nas proteínas da classe I, existem um grau médio de similaridade e afinidade (entre os 41-60%), e para as proteínas da classe II este grau de identidade é baixo entre elas (de 0-40%).

Para melhor compreensão dos dados obtidos de identidade, realizamos análises filogenéticas entre as enzimas de cada classe para avaliar com maior profundidade sua similaridade e origem. Com isso, observamos que para as KDACs da classe I, CaHos2 e ScHos2 existe uma certa afinidade e similaridade entre elas, já em contrapartida a proteína AfHosA apresenta distanciamento entre as ramificações, o mesmo ocorre com as proteínas CaHos1 e ScHos1, que possuem ramos distintos das demais apresentadas anteriormente. No caso das KDACs classe II, as proteínas CaHos3 e ScHos3 possuem nível de similaridade que consideramos alto, pois se apresentam no mesmo ramo evolutivo e mesmo ancestral. Para as proteínas CaHda1, ScHda1 e AfHdaA, parecem ter uma origem comum entre si, porém, logo em seguida da origem dois ramos distintos são formados, um contendo AfHdaA e outro contendo ScHda1 e CaHda1.

Na etapa de obtenção dos modelos tridimensionais das KDACs de *C. albicans*, *A. fumigatus* e *S. cerevisiae*, gerados através do software AlphaFold, que é uma tecnologia de última geração de inteligência artificial, verificamos que todos os modelos obtidos possuíam um grau alto de confiança, o que permitiu a utilização dos mesmos nas etapas de análises estruturais comparativas. Baseando-se em dados publicados dos resíduos que compõem a região do sítio catalítico da HDAC1 de seres humanos, histidinas H140, H141, H178; tirosina Y303 e os ácidos aspárticos D176 e D264, fizemos o alinhamento das sequências de aminoácidos do domínio HDAC com a

classe I dos fungos estudados *C. albicans*, *A. fumigatus* e *S. cerevisiae*, e assim pudemos identificar os resíduos que fazem parte do sítio catalítico dessas enzimas. Verificamos um alto grau de conservação nos resíduos, como mostra nas Tabelas 3, 4 e 5. Em seguida, confirmamos que na estrutura predita estes resíduos estão realmente localizados na região do sítio catalítico, como esperado para as KDACs da classe I.

Para a classe II, foi utilizado o mesmo método de análise, tendo como base o trabalho publicado por Lee et al., 2021. Neste estudo, os autores caracterizaram o sítio ativo da proteína Hda1 de *S. cerevisiae*, indicando os resíduos pertencentes ao sítio catalítico como sendo: Histidinas H205, H206 e H247; Tirosina Y378 e ácidos aspárticos D245 e D338; além de sua localização estrutural na região do sítio ativo. Tendo conhecimento destes estudos, fizemos o alinhamento das sequenciais das proteínas HDAC4 de seres humanos, sendo uma das HDACs mais estudadas, com as proteínas da classe II dos fungos *C. albicans*, *A. fumigatus* e *S. cerevisiae*, e após estas análises identificamos os resíduos pertencentes a classe II de *C. albicans* e *A. fumigatus*. Além disso, confirmamos que os resíduos estavam localizados na região estrutural que compõem o sítio catalítico das enzimas analisadas.

Após a obtenção dos resultados apresentados anteriormente e considerando a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das doenças causadas por *C. albicans* e *A. fumigatus*, e o potencial que as lisinas desacetilases possuem para serem exploradas como alvos terapêuticos, realizamos análises comparativas entre as enzimas da classe I e II de *C. albicans* e *A. fumigatus* com HDACs humanas pertencentes as mesmas classes. Os resultados obtidos tornaram evidente que do ponto de vista de potencial como alvos de drogas os membros da classe II de *C. albicans* e *A. fumigatus* são mais promissores comparados com as enzimas da classe I, pois apresentaram graus de similaridades menores.

Em 1990, foi descoberto um potente inibidor de KDACs a partir de produto natural Tricostatina A (TSA-A). O TSA-A foi isolado de uma cepa de *Streptomyces* e originalmente identificado como um antibiótico antifúngico. Posteriormente, verificou-se que o TSA-A era capaz de inibir a atividade de KDACs purificadas em concentrações na faixa de nanomolar, ao mesmo tempo que células mutantes para uma KDAC específica eram mais resistentes ao TSA, fornecendo evidências genéticas de que as essas enzimas eram o alvo primário do TSA (revisado em Seto E et al., 2014). Hoje, TSA é considerado um inibidor clássico das KDACs das classes I e II. Considerando todas as características estruturais que encontramos para as KDACs de *C. albicans* e *A. fumigatus* e o fato de termos verificado que CaHos1 possui baixa taxa de identidade com HDAC1, assim como, CaHos3 e AfHdaB, apresentam graus de identidade baixos

comparados com HDAC4 humana, decidimos realizar ensaios de docking molecular para as enzimas dos fungos utilizando o inibidor TSA e averiguar se este inibidor era capaz de interagir na região do sítio catalítico dessas enzimas, como descrito para HDAC1 e 4 (Seto et al., 2014). Como esperado, verificamos para ambas as proteínas que TSA interage especificamente na região do sítio ativo (Figura 15). Também observamos que TSA interage na região do sítio ativo de CaHos1 e CaHos3, enquanto a interação com AfHdaB acontece em uma região distinta do sítio ativo (Figura 15).

Assim, fica evidente o potencial de explorar moléculas derivadas de TSA-A como inibidores das KDACs de *C. albicans* e *A. fumigatus*, que futuramente possa servir para tratamento das doenças causadas por esses fungos.

5. Conclusões Gerais

Neste trabalho utilizando a poderosa ferramenta de predição de estruturas proteicas, AlphaFold, fomos capazes de gerar modelos para todas as KDACs das classes I e II de *C. albicans*, *A. fumigatus*, *S. cerevisiae* e HDACs humanas, confirmando o potencial dessa ferramenta. Esses modelos permitiram que nós estudássemos de maneira mais profunda as características estruturais dessas enzimas com o intuito final de pelo menos predizer o potencial de explorá-las como alvos de drogas para desenvolvimento de novas terapêuticas para as doenças causadas por *C. albicans* e *A. fumigatus*.

Constatamos que as KDACs de *C. albicans* e *A. fumigatus* possuem os resíduos descritos como parte do sítio catalítico (His, Asp e Tyr) e importantes para atividade de desacetilação extremamente conservados quando comparados com as KDACs humanas, por exemplo. No entanto, não observamos a substituição do resíduo de Tyr por His, característico na classe IIa de HDACs humanas, em nenhuma das proteínas de *C. albicans* ou *A. fumigatus*.

Apesar da conservação dos resíduos presentes no sítio catalítico nas KDACs dos fungos, ao compararmos as identidades de sequência e estrutural delas com as enzimas HDAC1 e HDAC4 humanas, identificamos CaHos1, CaHos3 e AfHdaB, com potencial de serem exploradas como alvos de drogas. Além disso, verificamos por análises de docking molecular que o inibidor clássico de KDACs da classe I e II, TSA, é capaz de interagir com CaHos1, CaHos3 e AfHdaB correspondentes ao sítio catalítico.

Em conclusão, podemos dizer que o AlphaFold apresenta robustez para a obtenção de modelos tridimensionais preditos de proteínas e que através das análises iniciais que realizamos podemos sugerir que CaHos1, CaHos3 e AfHdaB possuem potencial de serem estudadas como alvos de drogas. Esse potencial se refere ao fato delas apresentarem baixos graus de identidade em todos os aspectos analisados, comparadas com HDACs humanas. Obviamente, outros aspectos precisam ser avaliados e novas análises precisariam ser realizadas, tanto do ponto de vista estrutural como de análises experimentais.

6. Trabalho Futuro

A ferramenta AlphaFold tem revolucionado a área de estudos de biologia estrutural. Através desse software podemos explorar novos mecanismos para desenvolvimento de tratamentos medicinais. No que tange nosso trabalho, poderemos utilizar a mesma estratégia de estudos para as proteínas da classe III das KDACs, sirtuínas, de *C. albicans*, *A. fumigatus*, e assim, não só avaliar suas características estruturais, mas também investigar seu potencial terapêutico. Além disso, essa abordagem pode ser aplicada para KDACs de qualquer organismo, contribuindo para o estudo de novos alvos terapêuticos para várias outras doenças em seres humanos.

7. Referências Bibliográficas

1. Oliveira, Jeferson Carvalhaes. 2014. Tópicos em Micologia Médica, 4th edition Rio de Janeiro; 2014. col. ISBN 85-900986-1-3 . pp. 22, 23 e 24
2. Tortora, Gerard J; Funke, Berdell R; Case, Christine L. 2017. Explorando os eucariotos patogênicos. In: Microbiologia (12 ed. Artmed), Porto Alegre. pp.320-321-327-330.
3. Góralaska, K., Blaszkowska, J., & Dzikowiec, M. (2018). Neuroinfections caused by fungi. *Infection*, 46(4), 443–459. <https://doi.org/10.1007/s15010-018-1152-2>
4. Köhler, J. R., Casadevall, A., & Perfect, J. (2014). The spectrum of fungi that infects humans. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(1), a019273. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019273>
5. Limper, A. H., Adenis, A., Le, T., & Harrison, T. S. (2017). Fungal infections in HIV/AIDS. *The Lancet. Infectious diseases*, 17(11), e334–e343. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30303-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30303-1)
6. Francisco, Mariana RCM. 2017. Caracterização de isolados de *Aspergillus* provenientes de ambiente hospitalar-identificação molecular e determinação dos padrões de susceptibilidade aos antifúngicos. MSc dissertation. Lisboa. Pp.1-2. Disponível: Universidade de Lisboa-Faculdade de Ciências-Departamento de Biologia animal. Ulf12077_tm_Mariana_Francisco.
7. van de Veerdonk, F. L., Gresnigt, M. S., Romani, L., Netea, M. G., & Latgé, J. P. (2017). *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nature reviews. Microbiology*, 15(11), 661–674. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.90>
8. Van den Nest, M., Wagner, G., Riesenhuber, M., Dolle, C., Presterl, E., Gartlehner, G., Moertl, D., & Willinger, B. (2021). Filamentous Fungal Infections in a Tertiary Care Setting: Epidemiology and Clinical Outcome. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(1), 40. <https://doi.org/10.3390/jof7010040>
9. Latgé, J. P., & Chamilos, G. (2019). *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clinical microbiology reviews*, 33(1), e00140-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00140-18>

10. Denning, D. W., Cadranell, J., Beigelman-Aubry, C., Ader, F., Chakrabarti, A., Blot, S., Ullmann, A. J., Dimopoulos, G., Lange, C., & European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases and European Respiratory Society (2016). Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *The European respiratory journal*, 47(1), 45–68. <https://doi.org/10.1183/13993003.00583-2015>
11. Maertens, J. A., Raad, I. I., Marr, K. A., Patterson, T. F., Kontoyiannis, D. P., Cornely, O. A., Bow, E. J., Rahav, G., Neofytos, D., Aoun, M., Baddley, J. W., Giladi, M., Heinz, W. J., Herbrecht, R., Hope, W., Karthaus, M., Lee, D. G., Lortholary, O., Morrison, V. A., Oren, I., ... Ullmann, A. J. (2016). Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. *Lancet (London, England)*, 387(10020), 760–769. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01159-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01159-9)
12. Liss, B., Vehreschild, J. J., Bangard, C., Maintz, D., Frank, K., Grönke, S., Michels, G., Hamprecht, A., Wisplinghoff, H., Markiefka, B., Hekmat, K., Vehreschild, M. J., & Cornely, O. A. (2015). Our 2015 approach to invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses*, 58(6), 375–382. <https://doi.org/10.1111/myc.12319>
13. Garcia-Rubio, R., Alcazar-Fuoli, L., Monteiro, M. C., Monzon, S., Cuesta, I., Pelaez, T., & Mellado, E. (2018). Insight into the Significance of *Aspergillus fumigatus* cyp51A Polymorphisms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(6), e00241-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00241-18>
14. Vila, T., Romo, J. A., Pierce, C. G., McHardy, S. F., Saville, S. P., & Lopez-Ribot, J. L. (2017). Targeting *Candida albicans* filamentation for antifungal drug development. *Virulence*, 8(2), 150–158. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1197444>
15. Li, Y., Sun, L., Lu, C., Gong, Y., Li, M., & Sun, S. (2018). Promising Antifungal Targets Against *Candida albicans* Based on Ion Homeostasis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 286. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00286>
16. Vieira, Juliana. Rocha, Mayara. Lourenço, Rayssa. Moreira, Vanessa. Kashiwabara Tatiliana. 2014. Candidíase uma revisão literária. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR*; Vol.8,n.2, pp.75-82 <http://www.mastereditora.com.br/bjscr>

17. R, A. N., & Rafiq, N. B. (2022). Candidiasis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
18. Willems, H., Ahmed, S. S., Liu, J., Xu, Z., & Peters, B. M. (2020). Vulvovaginal Candidiasis: A Current Understanding and Burning Questions. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 6(1), 27. <https://doi.org/10.3390/jof6010027>
19. Ghaddar, N., Anastasiadis, E., Halimeh, R., Ghaddar, A., Dhar, R., AlFouzan, W., Yusef, H., & El Char, M. (2020). Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* causing vaginal discharge among pregnant women in Lebanon. *BMC infectious diseases*, 20(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4736-2>
20. Kullberg, B. J., & Arendrup, M. C. (2015). Invasive Candidiasis. *The New England journal of medicine*, 373(15), 1445–1456. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1315399>
21. Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., Reboli, A. C., Schuster, M. G., Vazquez, J. A., Walsh, T. J., Zaoutis, T. E., & Sobel, J. D. (2016). Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 62(4), e1–e50. <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>
22. Retanal, C., Ball, B., & Geddes-McAlister, J. (2021). Post-Translational Modifications Drive Success and Failure of Fungal-Host Interactions. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(2), 124. <https://doi.org/10.3390/jof7020124>
23. Wassano, N. S., Leite, A. B., Reichert-Lima, F., Schreiber, A. Z., Moretti, N. S., & Damasio, A. (2020). Lysine acetylation as drug target in fungi: an underexplored potential in *Aspergillus* spp. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 51(2), 673–683. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00253-w>
24. Chen, J., Liu, Q., Zeng, L., & Huang, X. (2020). Protein Acetylation/Deacetylation: A Potential Strategy for Fungal Infection Control. *Frontiers in microbiology*, 11, 574736. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.574736>
25. ALLFREY, V. G., FAULKNER, R., & MIRSKY, A. E. (1964). ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51(5), 786–794. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.5.786>

26. Narita, T., Weinert, B. T., & Choudhary, C. (2019). Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(3), 156–174. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0081-3>
27. Zhou, X., Qian, G., Yi, X., Li, X., & Liu, W. (2016). Systematic Analysis of the Lysine Acetylome in *Candida albicans*. *Journal of proteome research*, 15(8), 2525–2536. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00052>
28. Li, Y., Li, H., Sui, M., Li, M., Wang, J., Meng, Y., Sun, T., Liang, Q., Suo, C., Gao, X., Li, C., Li, Z., Du, W., Zhang, B., Sai, S., Zhang, Z., Ye, J., Wang, H., Yue, S., Li, J., ... Ding, C. (2019). Fungal acetylome comparative analysis identifies an essential role of acetylation in human fungal pathogen virulence. *Communications biology*, 2, 154. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0419-1>
29. Wang, G., Guo, L., Liang, W., Chi, Z., & Liu, L. (2017). Systematic analysis of the lysine acetylome reveals diverse functions of lysine acetylation in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *AMB Express*, 7(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0393-2>
30. Xu, X., Liu, T., Yang, J., Chen, L., Liu, B., Wang, L., & Jin, Q. (2018). The First Whole-Cell Proteome- and Lysine-Acetylome-Based Comparison between *Trichophyton rubrum* Conidial and Mycelial Stages. *Journal of proteome research*, 17(4), 1436–1451. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00793>
31. Marmorstein, R., & Zhou, M. M. (2014). Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(7), a018762. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018762>
32. Seto, E., & Yoshida, M. (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(4), a018713. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018713>
33. Fujisawa, T., & Filippakopoulos, P. (2017). Functions of bromodomain-containing proteins and their roles in homeostasis and cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(4), 246–262. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.143>
34. Spinck, M., Ecke, M., Schiller, D., & Neumann, H. (2021). A Directed Evolution System for Lysine Deacetylases. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2247, 319–337. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1126-5_18

35. Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., & Hrabeta, J. (2017). Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *International journal of molecular sciences*, *18*(7), 1414. <https://doi.org/10.3390/ijms18071414>
36. Liu, Y., Yang, H., Liu, X., Gu, H., Li, Y., & Sun, C. (2021). Protein acetylation: a novel modus of obesity regulation. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, *99*(9), 1221–1235. <https://doi.org/10.1007/s00109-021-02082-2>
37. Watson, P. J., Fairall, L., Santos, G. M., & Schwabe, J. W. (2012). Structure of HDAC3 bound to co-repressor and inositol tetraphosphate. *Nature*, *481*(7381), 335–340. <https://doi.org/10.1038/nature10728>
38. Toro, T. B., & Watt, T. J. (2020). Critical review of non-histone human substrates of metal-dependent lysine deacetylases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *34*(10), 13140–13155. <https://doi.org/10.1096/fj.202001301RR>
39. Yoshida, M., Kudo, N., Kosono, S., & Ito, A. (2017). Chemical and structural biology of protein lysine deacetylases. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, *93*(5), 297–321. <https://doi.org/10.2183/pjab.93.019>
40. Van Dyke M. W. (2014). Lysine deacetylase (KDAC) regulatory pathways: an alternative approach to selective modulation. *ChemMedChem*, *9*(3), 511–522. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201300444>
41. Shukla, S., & Tekwani, B. L. (2020). Histone Deacetylases Inhibitors in Neurodegenerative Diseases, Neuroprotection and Neuronal Differentiation. *Frontiers in pharmacology*, *11*, 537. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00537>
42. Chen, J., Liu, Q., Zeng, L., & Huang, X. (2020). Protein Acetylation/Deacetylation: A Potential Strategy for Fungal Infection Control. *Frontiers in microbiology*, *11*, 574736. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.574736>
43. Sauty, S. M., Shaban, K., & Yankulov, K. (2021). Gene repression in *S. cerevisiae*-looking beyond Sir-dependent gene silencing. *Current genetics*, *67*(1), 3–17. <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01114-7>
44. Bauer, I., Misslinger, M., Shadkchan, Y., Dietl, A. M., Petzer, V., Orasch, T., Abt, B., Graessle, S., Osherov, N., & Haas, H. (2019). The Lysine Deacetylase RpdA Is Essential for Virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in microbiology*, *10*, 2773. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02773>

45. Garnaud, C., Champleboux, M., Maubon, D., Cornet, M., & Govin, J. (2016). Histone Deacetylases and Their Inhibition in *Candida* Species. *Frontiers in microbiology*, 7, 1238. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01238>
46. Wang, Q., Rosa, B. A., Nare, B., Powell, K., Valente, S., Rotili, D., Mai, A., Marshall, G. R., & Mitreva, M. (2015). Targeting Lysine Deacetylases (KDACs) in Parasites. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(9), e0004026. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004026>
47. Lamoth, F., Juvvadi, P. R., Soderblom, E. J., Moseley, M. A., Asfaw, Y. G., & Steinbach, W. J. (2014). Identification of a key lysine residue in heat shock protein 90 required for azole and echinocandin resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(4), 1889–1896. <https://doi.org/10.1128/AAC.02286-13>
48. Robbins, N., Leach, M. D., & Cowen, L. E. (2012). Lysine deacetylases Hda1 and Rpd3 regulate Hsp90 function thereby governing fungal drug resistance. *Cell reports*, 2(4), 878–888. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.035>
49. Nguyen, L. N., Lopes, L. C., Cordero, R. J., & Nosanchuk, J. D. (2011). Sodium butyrate inhibits pathogenic yeast growth and enhances the functions of macrophages. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(11), 2573–2580. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr358>
50. Serpell, L. C., Radford, S. E., & Otzen, D. E. (2021). AlphaFold: A Special Issue and A Special Time for Protein Science. *Journal of molecular biology*, 433(20), 167231. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167231>
51. David, A., Islam, S., Tankhilevich, E., & Sternberg, M. (2022). The AlphaFold Database of Protein Structures: A Biologist's Guide. *Journal of molecular biology*, 434(2), 167336. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167336>
52. Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Žídek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., Figurnov, M., ... Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic acids research*, 50(D1), D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>

53. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
54. Tunyasuvunakool, K., Adler, J., Wu, Z., Green, T., Zielinski, M., Židek, A., Bridgland, A., Cowie, A., Meyer, C., Laydon, A., Velankar, S., Kleywegt, G. J., Bateman, A., Evans, R., Pritzel, A., Figurnov, M., Ronneberger, O., Bates, R., Kohl, S., Potapenko, A., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature*, 596(7873), 590–596. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03828-1>
55. Bottomley, M. J., Lo Surdo, P., Di Giovine, P., Cirillo, A., Scarpelli, R., Ferrigno, F., Jones, P., Neddermann, P., De Francesco, R., Steinkühler, C., Gallinari, P., & Carfi, A. (2008). Structural and functional analysis of the human HDAC4 catalytic domain reveals a regulatory structural zinc-binding domain. *The Journal of biological chemistry*, 283(39), 26694–26704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803514200>
56. Marek, M., Ramos-Morales, E., Picchi-Constante, G., Bayer, T., Norström, C., Herp, D., Sales-Junior, P. A., Guerra-Slompo, E. P., Hausmann, K., Chakrabarti, A., Shaik, T. B., Merz, A., Troesch, E., Schmidtkunz, K., Goldenberg, S., Pierce, R. J., Mourão, M. M., Jung, M., Schultz, J., Sippl, W., ... Romier, C. (2021). Species-selective targeting of pathogens revealed by the atypical structure and active site of *Trypanosoma cruzi* histone deacetylase DAC2. *Cell reports*, 37(12), 110129. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110129>
57. de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., & van Kuilenburg, A. B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *The Biochemical journal*, 370(Pt 3), 737–749. <https://doi.org/10.1042/BJ20021321>
58. Lee, J. H., Bollschweiler, D., Schäfer, T., & Huber, R. (2021). Structural basis for the regulation of nucleosome recognition and HDAC activity by histone deacetylase assemblies. *Science advances*, 7(2), eabd4413. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd4413>